

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Nina Raič

TERAPIJSKI NANOSUSTAVI NA BAZI LIPIDA – ČVRSTE LIPIDNE NANOČESTICE,  
IZAZOVI RAZVOJA I PROIZVODNJE

Specijalistički rad

Zagreb, 2018

Poslijediplomski specijalistički studij Razvoj lijekova

Mentor rada: dr.sc. Biserka Cetina-Čižmek, znanstv.savjetnica

Specijalistički rad obranjen je dana 18. srpnja 2018. godine u Maloj predavaonici farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Domagojeva 2, pred povjerenstvom u sastavu:

1. dr.sc. Marijana Erceg, znanstvena suradnica  
PLIVA Hrvatska d.o.o.
2. dr.sc. Biserka Cetina-Čižmek, znanstv.savjetnica  
PLIVA Hrvatska d.o.o.
3. izv.prof.dr.sc. Željka Vanić  
Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Rad ima 79 listova.

## SAŽETAK

### *CILJ ISTRAŽIVANJA*

Svrha ovog specijalističkog rada je razraditi problematiku razvoja i industrijski aspekt terapijskih nanosustava temeljenih na lipidima u obliku čvrstih lipidnih nanočestica (engl. *solid lipid nanoparticle*, SLN). Problematika će biti razrađena unutar okvira postojećih regulatornih smjernica i dostupne literature. Čvrste lipidne nanočestice odabrane su kao područje od velikog interesa industrije i znanosti, te zbog činjenice da su biološki kompatibilni sustavi, imaju veliki raspon modifikacija, i mogu se proizvesti standardnim postupcima proizvodnje u usporedbi s ostalim oblicima terapijskih nanosustava.

### *MATERIJALI I METODE*

Pretraživanje literature napravljeno je prema predmetu istraživanja (ključne riječi; *lipid, nano therapeutic, solid lipid nanoparticles, drug delivery*), istaknutim autorima na tom području (Müller, Shah) i časopisima (*J. Control Release, Adv. Drug Deliv. Rev., Int. J. Pharm.*). Pretraživane su bibliografska baza podataka (PubMed) i baza podataka s cjelovitim tekstom (Science Direct). Literatura je pretraživana od općih prema specijaliziranim člancima pri čemu su odabrani članci relevantni za problematiku ovoga specijalističkog rada. Također rad obuhvaća i analize godišnjih izvještaja i smjernica izdanih od strane vodećih regulatornih agencija kao što su Europska agencija za lijekove (EMA) i američka agencija za hranu i lijekove (FDA). U radu je korišten pojmovnik Agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) objavljen u Zakonu o lijekovima (NN, br. 76/13.).

### *REZULTATI*

SLN siguran su i efikasan oblik terapijskog nanosustava temeljenog na lipidima u svrhu povećanja bioraspoloživosti slabo topljivih lijekova. Odabir prikladne metode priprave ovisi o fizikalno-kemijskim karakteristikama lijeka i lipida, te ciljanoj veličini čestica koja se želi postići. Sve metode priprave ovise o dva kritična procesa; nastanak emulzije i disperzija čestica u

vodenoj otopini kako bi se omogućila kristalizacija lipida i/ili lijeka. Kontrolom kritičnih procesnih parametara kao što je temperatura, tlak i broj ciklusa može se postići ciljani profil kakvoće SLN-a. SLN se mogu proizvesti standardnim metodama pripreve bez korištenja organskih otapala što je prednost u odnosu na druge nanosustave. Detaljna fizikalno-kemijska karakterizacija neophodna je razvoju SLN-a s uklopljenim lijekom i postizanju fizičke stabilnosti koloidne suspenzije nanočestica. Strukturna kompleksnost i veličina čestica čine karakterizaciju izazovom, te zahtijeva upotrebu više komplementarnih analitičkih tehnika. Rast čestica, formiranje gela, polimorfni prijelazi učestali su problemi koji se mogu pojaviti kod razvoja SLN te je potrebno ispitati uvjete i okolnosti u kojima nastaju kako bi se isti izbjegli. Primjenom koncepta kakvoće utemeljene kroz dizajn uspostavlja se sustavni pristup razvoju sustava SLN-lijek kroz razumijevanje proizvodnog postupka i proizvoda.

### *ZAKLJUČAK*

Terapijski nanosustavi temeljeni na lipidima siguran su i efikasni oblik nosača djelatne tvari zbog svoje biokompatibilnosti s fiziološkim sustavima. Zbog nanometarske veličine mogu lakše proći sve važne biološke barijere raznim transcelularnim mehanizmima te dovesti lijek do mjesta djelovanja u nepromijenjenom obliku uz smanjenje karakterističnih nuspojava koje se javljaju primjenom standardnih oblika terapija. SLN su prva generacija terapijskih nanosustava temeljenih na lipidima i od velikog su interesa industrije zbog jednostavnosti metoda pripreve i širokog raspona modifikacija. Ovisno o odabiru ishodnih sirovina i metode pripreve SLN-a moguće je postići trenutno ili modificirano (produljeno, odgođeno) oslobađanje lijeka iz sustava.

## SUMMARY

### *OBJECTIVES*

The objective of this paper is to elaborate problematics of development and industrial aspect of lipid based nanotherapeutics in the form of solid lipid nanoparticles. Topic will be elaborated within existing regulatory guidance and available literature. Solid lipid nanoparticles are chosen as area of great industry and scientific interest and for the fact that these are biologically compatible systems that have big span of modifications that can be produced by standard manufacturing methods, in comparison to other types of therapeutic nanosystems.

### *MATERIALS AND METHODS*

The literature is searched by research subject (keywords; *lipid, nanotherapeutic, solid lipid nanoparticles, drug delivery*), known authors in this area (Müller, Shah) and journals (*J. Control Release, Adv. Drug Deliv. Rev., Int. J. Pharm.*). Bibliographic database (PubMed) and database with full text (Science Direct) were researched. The literature is searched from general to specialized articles whereby only articles that are relevant for this subject were chosen. As well, this paper also covers analysis of annual reports and guidance published by headmost regulatory agencies as European Medicines Agency (EMA) and US Food and Drug Administration (FDA). Definition of terms was used as published in Medicinal Products Act (Official Gazette No. 76/13), Agency for Medicinal Products and Devices (HALMED).

### *RESULTS*

Solid lipid nanoparticles (SLN) are safe and efficient form of lipid nanoparticles for the purpose of bioavailability enhancement of low soluble drugs. Selection of appropriate preparation method depends of physicochemical characteristics of drug and lipid and targeted particle size required to achieve. All these preparation methods depend on two critical processes; emulsion formation and particles dispersion in water solution to enable lipid or/and drug crystallization. Control of critical process parameters like temperature, pressure and number of cycles can be used to achieve quality target product profile of SLN. SLN can be produced by standard manufacturing methods without use of organic solvents which is advantage to certain other

therapeutic nanosystems. Detailed physicochemical characterization is necessary in the development of SLN with incorporated drug and to achieve physical stability of colloidal nanoparticles suspension. Structural complexity and particle size are making characterization a challenge; therefore multiple complementary analytical techniques are required to be employed. Particle growth, formation of gel structures, polymorphic transitions are most common problems to appear in SLN development therefore in order to avoid them, it is necessary to investigate conditions and circumstances under which there occur. Employing quality by design as concept establishes systematic approach to the development of the SLN-drug system through understanding of manufacturing process and the final product.

## *CONCLUSION*

Lipid nanoparticles are safe and efficient form of drug carrier due to its biocompatibility with the physiological systems. Because of the nanometer size, these can pass through all important biological barriers by various transcellular mechanisms and bring drug to the site of action in its unchanged form, accompanied by reduced characteristic side effects which occur with administration of standard forms of therapy. SLN are first generation of lipid nanoparticles and present a great interest of industry because of simplicity of manufacturing methods and wide span of modifications. Depending on choice of starting materials and manufacturing method of SLN, it is possible to achieve immediate or modified (prolonged, delayed) release of drug from the system.

## SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....	1
1.1 Primjena nanotehnologije u farmaceutskoj industriji.....	1
1.1.1 Regulatorni okviri, smjernice i inovativne radne grupe.....	1
1.1.2 Terapijski nanosustavi i ciljani mehanizam djelovanja.....	4
1.2 Oblici terapijskih nanosustava temeljenih na lipidima.....	5
1.2.1 Čvrste lipidne nanočestice.....	9
1.2.2 Vrste čvrstih lipidnih nanočestica .....	14
1.2.3 Metode pripreme SLN-a.....	16
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	32
3. MATERIJALI I METODE .....	33
4. RASPRAVA .....	34
4.1 Prednosti formulacija temeljenih na čvrstim lipidnim nanočesticama.....	34
4.1.1 Primjena SLN čestica u antiviralnoj terapiji .....	36
4.1.2 Primjena SLN čestica u genskoj terapiji .....	39
4.1.3 Primjena SLN čestica u imunosupresivnoj terapiji .....	40
4.2 Aspekti razvoja i karakterizacija SLN-a.....	42
4.3 Fizikalno kemijska karakterizacija SLN-a .....	42
4.3.1 Veličina, morfologija i struktura SLN-a .....	42
4.3.2 Polimorfizam i kristalizacija lipida .....	46
4.3.3 Zeta potencijal i naboj na površini SLN-a .....	49
4.4 Fizikalna i kemijska stabilnost SLN-a.....	53
4.5 Profili oslobađanja lijeka iz SLN-a i <i>in vitro-in vivo</i> korelacija.....	54
4.6 Primjena QbD koncepta tijekom razvoja i proizvodnje SLN-a.....	56
5. ZAKLJUČAK .....	63
6. LITERATURA .....	64
KRATICE.....	71
7. ŽIVOTOPIS .....	73

# 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

## 1.1 Primjena nanotehnologije u farmaceutskoj industriji

### 1.1.1 Regulatorni okviri, smjernice i inovativne radne grupe

Iako je primjena nanotehnologije u farmaciji poprilično novija znanstvena disciplina, istraživanje materijala u submikronskim veličinama datira još od 19 stoljeća kada je 1857. godine Michael Faraday otkrio da koloidni sustav nanostrukturiranih čestica zlata ima drugačiju boju ako se promatra pri određenim svjetlosnim uvjetima. 1956. godine Arthur von Hippel uvodi koncept i termin molekularnog inženjeringa koje koristi u istraživanjima električnih sustava feroelektrika i dielektrika. No prvo predavanje o tehnologiji i inženjeringu na razini atoma dao je 1959. Richard Feynman u svom poznatom govoru „*Plenty of Room at the Bottom*“ (1) koji je trebao biti poticaj akademskoj zajednici da se objedine znanosti kemije, fizike i biologije u svrhu otkrivanja mogućnosti sintetiziranja ciljanih molekula. Njegov govor smatra se jednim od prvih vjesnika pojma dizajniranog molekularnog sustava s ciljanim mehanizmom djelovanja. Ulazak nanotehnologije u farmaceutsku industriju dešava se 30-tak godina kasnije i izaziva veliki preokret u razvoju novih formulacija. Otvorila su se potpuno nova područja istraživanja i razvoja, ubrzava se proces pronalaska novih lijekova za određene bolesti te se istodobno povećava efikasnost i sigurnost primjene postojećih lijekova. Nedostaci postojećih formulacija slabo topljivih i lipofilnih lijekova s kojima se farmaceutska industrija borila godinama odjednom se mogu riješiti primjenom nanotehnologije u vidu dizajna ciljanog molekularnog sustava. Europska tehnološka platforma (engl. *European Technology Platform*; ETP) za nanomedicinu objavila je 2005. godine dokument engl. *vision paper* u kojem je iznijela osnovne smjernice upotrebe nanotehnologije u medicini (2). Prema tome, pojam nanomedicine obuhvaća tri važna područja; nanodijagnostika, „ciljani mehanizam djelovanja i kontrola oslobađanja“ i regenerativna medicina. Poglavlje ciljani mehanizam djelovanja i kontrola oslobađanja obuhvaća terapijske nanosustave i njihov koncept. Prema odrednicama istog dokumenta, nanotehnologija je razumijevanje i kontrola dimenzija materije u rasponu od 1 do 100 nanometara. Nanotehnologija obuhvaća mjerenje, modeliranje, predočavanje i manipuliranje materijom u



navedenom rasponu. Slične definicije izdala je u svojoj preporuci i Europska komisija (3) koja kao jedini i najprikladniji kriterij u definiranju nanomaterijala navodi svojstvo veličine čestica, no kako navedene vrijednosti ne bi postale ograničavajuće u definiranju nanomaterijala, preporuka je koristiti se svojstvom distribucije veličina čestica. Ako uzmemo sve preporuke u obzir onda možemo reći da pod pojmom nanomaterijala podrazumijevamo prirodni, slučajni ili proizvedeni materijal koji sadrži čestice, u vezanom ili slobodnom obliku, s distribucijom čestica u omjeru 50% i više, u rasponu veličine 1-100 nm. Navedena definicija koristi se kao službena „identifikacija“ EU nadležnih tijela za nanomaterijale. Zakonske odredbe za njihovu upotrebu mogu biti definirane specifičnim regulativama pa tako regulativa i smjernice koje se odnose na nanolijekove ostaju u odgovornosti Europske medicinske agencije za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) i njenih odgovarajućih nadležnih odbora i inicijativa. Kako bi se pravovremeno pripremile za izazove nanotehnologije u farmaceutskoj industriji, najistaknutije regulatorne agencije EMA i američka agencija za lijekove (engl. *Federal Drug Agency*, FDA) osnovale su inovativne radne grupe posvećene isključivo nanotehnologiji i njezinoj primjeni u farmaceutskoj industriji. Povjerenstvo za lijekove za primjenu kod ljudi (engl. *Committee for Medicinal Products for Human Use*, CHMP) koje djeluje pri EMA-i već je izdalo niz preporuka za odobrenja lijekova proizvedenih korištenjem nanotehnologije kao što su Caelyx<sup>®</sup>, Myocet<sup>®</sup>, Rapamune<sup>®</sup>, Copaxone<sup>®</sup> i to u okvirima postojećih regulatornih smjernica na temelju pozitivnog omjera koristi i rizika (4). S obzirom da nanolijekovi pokazuju kompleksan mehanizam djelovanja kombinacijom mehaničkih, kemijskih, farmakoloških i imunoloških svojstava potreban je znanstveno usmjeren pristup njihovoj regulatornoj procjeni. Podnositelji zahtjeva za odobrenje moraju predati kompletnu dokumentaciju o lijeku koja sadrži podatke o njegovoj djelotvornosti, kvaliteti i sigurnosti primjene. Podaci o kakvoći lijeka i djelatne tvari prikupljaju se tokom razvoja dok je djelotvornost lijeka dokazana ako se radi o već poznatoj djelatnoj tvari. No kako bi pokazali sigurnost primjene lijeka potrebno je pokazati podatke prikladnih *in vitro* i *in vivo* toksikoloških studija, studija hematotoksičnosti i imunogenosti (5). Postoji veliki broj objavljenih publikacija o *in vitro* i *in vivo* studijama rađenih korištenjem SLN-a kao terapijskih nanosustava koji trenutno industriji mogu biti od informativne vrijednosti. Također je uveden pojam „nanosličnosti“ kada se radi o procjeni zahtjeva za nanolijek za koji se želi pokazati istovjetnost sa referentnim nanolijekom (6, 13). No istovjetnost lijekova temeljenih na

terapijskim nanosustavima kao djelatnim tvarima potrebno je pokazati kroz više elemenata u odnosu na standardni generički pristup; od fizikalno-kemijske sličnosti, prekliničkih studija na odgovarajućim animalnim modelima i bioekvivalencijskih studija (13). Sadržaj elemenata ovisi o sastavu samog terapijskog nanosustava. Primjerice, SLN pokazuju afinitet prema crvenim krvnim stanicama ili albuminu (protein krvne plazme) ovisno o sastavu lipida ili površinski aktivne tvari pa bi u tom slučaju trebalo napraviti prikladne studije (21). U tu svrhu, EMA je osnovala inovacijsku radnu grupu (engl. *Innovation Task Force*, ITF) čiji je zadatak koordinacija znanstvenih i regulatornih aktivnosti na području primjene nanotehnologije u lijekovima za ljudsku upotrebu. Kako bi se izbjegle negativne odluke tijekom procesa procjene zahtjeva za odobrenje novog lijeka, podnositelji zahtjeva pozvani su da već prilikom ranog razvoja nanolijekova surađuju sa EMA-om kroz formiranu inovacijsku radnu grupu ili koristeći proceduru znanstvenog savjetovanja.

Američka agencija za lijekove FDA također je formirala operativnu grupu (engl. *Nanotechnology Task Force*, NTF) s ciljem da definira regulatorni pristup koji će poticati razvoj inovativnih, sigurnih i efikasnih proizvoda koji koriste nanomaterijale, a istovremeno reguliranih FDA zakonima i smjernicama. Za razliku od europske inovacijske grupe ITF, predmet ove radne grupe nisu isključivo lijekovi u humanoj upotrebi već i drugi proizvodi kao što su hrana, duhanski proizvodi, veterinarski i medicinski proizvodi. Nakon prvog otvorenog sastanka u listopadu 2006, radna grupa objavila je izvještaj (7) koji obuhvaća preporuke i istraživanja prikupljena u periodu od samih početaka primjene nanotehnologije. U spomenutom izvještaju naglašeno je kako je nanotehnologija područje od velikog interesa i ulaganja na što ukazuje eksponencijalni rast u broju objavljenih članka; od 1990. kada je objavljeno otprilike 1000 publikacija do 2002 kada je taj broj premašio 22 000 s 1900 aplikacija za patente. Jedan od važnijih zaključaka spomenutog izvještaja je sljedeći; specifična površina čestica po jedinici volumena ili mase predstavlja važnije svojstvo za procjenu toksičnosti materijala nego njegova masa, odnosno da je predviđanje bioloških interakcija usko povezano za ispitivanja samog oblika čestice, njezine kemijske i fizikalne konfiguracije, karakteristika njezine površine, naboja i promjena na samoj površini čestice. To ne ukazuje nužno da su svi nanomaterijali opasni u usporedbi s istim u prirodnoj veličini, nego da bilo koje manje promjene u veličini čestica mogu

utjecati na svojstva materijala te njegove moguće biološke interakcije. Upravo zato je *in vitro* i *in vivo* karakterizacija nanolijekova kompleksan proces koji zahtjeva multidisciplinarni pristup.

### **1.1.2 Terapijski nanosustavi i ciljani mehanizam djelovanja**

Koncept terapijskog nanosustava se sastoji u dizajnu specifičnog molekularnog sustava ciljanog mehanizma djelovanja koji bi kao nosač lijeka kontrolirao njegovu farmakokinetiku prolaskom do mjesta djelovanja gdje bi onda započelo oslobađanje djelatne tvari u njenom izvornom obliku. Prednost ovih sustava je specifičnost i usmjerenost lijeka prema mjestu djelovanja, a to se može ostvariti jer:

- i) modifikacijom površine sustava možemo utjecati na stabilnost sustava ili ga učiniti prepoznatljivim staničnim membranama dodavanjem specifičnih liganda,
- ii) njihova nanometarska veličina olakšava prolazak preko fizioloških barijera što može dovesti lijek do samog mjesta djelovanja,
- iii) mogućnost da zadrži uklopljeni lijek u određenoj koncentraciji štiti lijek od utjecaja okoline do dolaska na mjesto djelovanja.

Time se povećava efikasnost djelovanja terapije, odnosno pri manjim dozama postiže se isti ili bolji terapijski učinak uz smanjenje broja nuspojava jer je djelovanje lijeka isključivo usmjereno na mjesto djelovanja. Lijekovi niske topljivosti najprikladniji su kandidati za ciljane molekulske sustave zbog njihove loše bioraspoloživosti, problem koji već dugo vremena predstavlja izazov farmaceutskoj znanosti i industriji. Da je problem od velikog značaja govori činjenica da je približno 40% novosintetiziranih molekula slabo topljivo u vodi (8). Terapijski nanosustavi pogodni su prvenstveno zbog svoje veličine jer mogu proći razne fiziološke barijere, što može biti ujedno i prednost i nedostatak. Smanjenjem veličine čestica povećava se broj mogućih bioloških interakcija sa enzimima i proteinima pa je time teže predvidjeti sve mehanizme interakcije. Istovremeno njihova izrazito malena veličina omogućuje prolazak nekih izuzetno teških barijera čime se ostvaruje potencijal u razvoju nove generacije ciljanih tumorskih terapija. Modifikacijom površine nanočestica vezanjem liganada (npr. antitijela, peptidi, oligosaharidi) nanočestice lijeka se ciljano usmjeravaju prema mjestu djelovanja, a navedena modifikacija istodobno štiti uklopljeni lijek od nepovoljnih interakcija u biološkom okruženju. S obzirom na

podrijetlo terapijski nanosustavi mogu biti biološki (fosfolipidi, lipidi, dekstran) ili sintetski (polimeri, silicij-dioksid, ugljik). Osnovna klasifikacija terapijskih nanosustava (9) temelji se kemijskoj strukturi samog nosača, pa tako razlikujemo polimerne, lipidne i anorganske nanosustave. U skupinu polimernih sustava spadaju nanosfere, nanokapsule, dendrimeri, micele i polisomi. Pod anorganskim nanosustavima podrazumijevamo metalne nanočestice, fuleren i ugljikove nanocijevčice, keramičke nanočestice i nanokristale. Terapijski nanosustavi temeljeni na lipidima podrazumijevaju dva oblika: čvrste lipidne čestice i vezikularne nanosustave-liposomi.

## **1.2 Oblici terapijskih nanosustava temeljenih na lipidima**

Lipidi kao derivati masnih kiselina su grupa spojeva čije je glavno i zajedničko svojstvo netopljivost u vodi. Važni su strukturni elementi bioloških membrana što čini lipide „prepoznatljivim“ molekulama u biološkom smislu i time idealnim nosačima. Osim izrazite biokompatibilnosti neke od ključnih prednosti lipida kao nosača su širok raspon modifikacija, veća otpornost prema eroziji od polimernih sustava te komercijalna održivost formulacija korištenjem jednostavnih proizvodnih postupaka (9). Stoga su terapijski nanosustavi temeljeni na lipidima siguran i efikasan način proizvodnje gotovih lijekova čija je glavna svrha povećanje bioraspoloživosti slabo topljivih djelatnih tvari, prijenos lijeka u odgovarajućem obliku do mjesta djelovanja te poboljšanje procesa ulaska lijeka u oboljele stanice odgovarajućih mehanizmima. Prednosti lipidnih formulacija slabo topljivih lijekova očituju se u sljedećem: lijek je otopljen unutar nosača čime se izbjegava korak otapanja (engl. *dissolution*), povećana je topljivost lijeka i olakšani transport kroz biološke membrane. Terapijski nanosustavi temeljeni na lipidima predmetom su velikog broja istraživanja i ujedno prvi koji su postali komercijalno dostupni na tržištu (10). Gotovi farmaceutski oblici na bazi terapijskih nanosustava temeljenih na lipidima mogu biti oralni, parenteralni, dermalni i transdermalni, okularni i vaginalni. Oralni put primjene preferirani je izbor zbog veće suradljivosti pacijenata.

Lipidni nosači poznati su već duže vrijeme farmaceutskoj industriji pod nazivom *Lipid based drug delivery systems* (LBDDs) (11). Građeni su od lipida i površinski aktivnih tvari (surfaktanata), a mogu sadržavati i su-otapalo. Klasifikacijski sustav lipidnih formulacija uveo je

autor Pouton 2000. godine prema kojem postoje četiri tipa modela ovisno o njihovom sastavu. Klasa I sustavi su jednostavne uljne otopine bez surfaktanata koji se sastoje od mono-, di-, triglicerida. Klasa II sustavi sadrže lipofilne surfaktante dodane u uljnu fazu kako bi se povećao kapacitet otapanja lijeka u sustavu i povećala stabilnost. Klasa III pored ulja i surfaktanta sadrži su-otapalo. Klasu IV sustave čine hidrofilni surfaktanti i su-otapala čime nastaju micelarne otopine. LBDD sustavi rješavaju problem apsorpcije i topljivosti slabo topljivih lijekova u gastrointestinalnom sustavu, no ne rješavaju problem lijekova ograničene bioraspoloživosti (npr. efavirenz) i visoke varijabilnosti (npr. tolperizon), odnosno kad je intraindividualni koeficijent varijacije veći od 30%. Upravo te probleme mogu riješiti terapijski nanosustavi temeljeni na lipidima koji bi trebali dopremiti lijek ciljano do mjesta djelovanja i time zaobići potencijalne barijere i mehanizme koji utječu na bioraspoloživost. Stoga se LBDD sustavi mogu smatrati svojevrsnim pretečama terapijskih nanosustava temeljenih na lipidima. Pregled lipidnih nosača, njihova svojstva i sastav klasificirani su u Tablici 1 (12).

**Tablica 1.** Pregled različitih vrsta lipidnih nosača (12)

Nosač	Veličina čestice	Sastav*	Svojstva
Liposomi	25 nm – nekoliko mikrometara	Fosfolipidi	Dvoslojne vezikule ispunjene vodenim medijem
Čvrste lipidne nanočestice	50-1000 nm	Lipidi visoke točke tališta	Koloidni nosači koji se sastoje od čvrste hidrofobne jezgre obavijene sa fosfolipidnim slojem
Uljne suspenzije	10 nm - nekoliko mikrometara	Ulja	Disperzija peptida i proteina u viskoznim uljima
Submikronske lipidne emulzije		Lipidi, hidrofilna otapala,	Emulzija vode, hidrofobne tekućine, i jednog ili više surfaktanta

		surfaktant	
Lipidni implantatni	Varira prema mjestu djelovanja	Lipidni kompakt	Disperzija lijeka u modulu na bazi lipida
Lipidne mikrotubule/mikrocilindri	<1 $\mu\text{m}$	Lipidi s prikladnim tipom surfaktanta	Kristalizacija surfaktanta u uskom dvosloju koja rezultira spontanom nastajanjem cilindra
Lipidni mikromjehurići	Nekoliko mikrometara	Lipidi, polimeri, proteini, fosfolipidi	Mikrosfere (visoko elastični mjehurići) ispunjene plinom stabilizirane fosfolipidima, polimerima ili proteinima
Liposfere	0,2 – 100 $\mu\text{m}$	Lipidi visoke točke tališta, fosfolipidi	Čvrste mikročestice raspršene u vodi koje se sastoje od čvrste hidrofobne jezgre (mast) stabilizirane sa slojem fosfolipida ugrađenog u površinu čestice

\* komponente mogu biti prirodnog ili sintetskog podrijetla

Kao što je već spomenuto, terapijski nanosustavi temeljeni na lipidima se dijele na dvije osnovne skupine: čvrste lipidne nanosustave i vezikularne fosfolipidne nanosustave (liposome). SLN kao oblik terapijskog nanosustava temeljenog na lipidima se smatraju novom generacijom lipidnih emulzija gdje je tekuća lipidna komponenta zamijenjena sa čvrstom lipidnom komponentom (15).

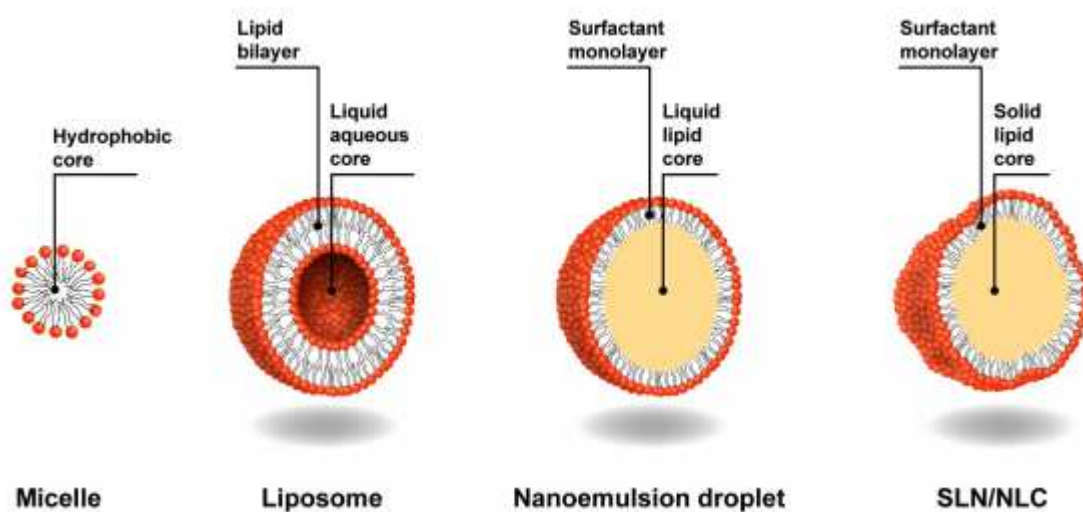
Liposomi su najstariji terapijski nanosustavi u kliničkoj praksi. Trenutno dostupne formulacije na tržištu (14) uglavnom su namijenjene parenteralnoj primjeni: Doxyl<sup>®</sup> ili Caelyx<sup>®</sup> (liposomski doksorubicin), DaunoXome<sup>®</sup> (liposomski danorubicin), AmBisome<sup>®</sup> (liposomski amfotericin B),

DepoCyt<sup>®</sup> (liposomski citarabin) itd. Liposomi imaju izražen problem stabilnosti te se industrija suočava s nizom ograničenja u komercijalnoj proizvodnji što uzrokuje defektne proizvode na tržištu. Primjerice Doxyl<sup>®</sup> (Janssen Products) se od veljače 2012. nalazi na tzv. FDA *Shortage list* zbog problema u proizvodnji te je kao korektivna mjera uvezen lijek Lipodox<sup>®</sup> (Sun Pharmaceuticals) koji nije odobren od strane FDA (14).

SLN u usporedbi s liposomima sadrže čvrstu lipidnu komponentu unutar koje je uklopljen lijek. Primjer lipidnog nosača čvrste jezgre su i liposfere (Tablica 1) koje su prema građi slične čvrstim lipidnim nanočesticama. Lipidnu komponentu terapijskih nanosustava temeljenih na lipidima mogu činiti fosfolipidi, kolesterol i mono-, di-, trigliceridi, no također mogu biti slobodne masne kiseline i žučne soli (15). To su prije svega biokompatibilne i biorazgradive pomoćne tvari koje imaju već uspostavljeni (engl. *well-established*) sigurnosni profil s prikladnim toksikološkim podacima što ujedno daje prednost SLN-u u odnosu na ostale terapijske nanosustave kao što su polimerne nanočestice, ugljikove nanocjevčice te metalne nanočestice. Iako se terapijski nanosustavi temeljeni na lipidima smatraju relativno sigurnim nosačima lijeka, zapravo su lipidna komponenta i prisutan surfaktant parametri koji utječu na interakcije s drugim sustavima. Kao što je već spomenuto, SLN pokazuju afinitet vezanja na krvne stanice i proteine plazme ovisno o sastavu lipida i vrsti surfaktanta za razliku od neutralnih liposoma (21). To svojstvo je izraženije ako je lipidna komponenta pozitivno ili negativno nabijena. Ti nedostaci mogu se nadvladati PEG-iliranjem fosfolipida, odnosno vezanjem fosfoetilenglikol liganda na lipidnu komponentu. Zbog svog biološkog podrijetla, lipidni nosači nose i niz izazova i ograničenja koje treba razmotriti pri razvoju takvih formulacija od kojih su najvažniji tendencija ka procesu kristalizacije koji rezultira nastajanjem polimorfa s potpuno drugačijim svojstvima i morfologijom čestica (17, 23). Polimorfni prijelazi uslijed kristalizacije lipida uzrokuju razgradnju sustava i naglo oslobađanje lijeka. Značajan problem terapijskih nanosustava predstavlja njihova stabilnost u fiziološkom okruženju. Potrebno je naglasiti da su lipidi također podložni reakcijama oksidacije koje rezultiraju nastankom lipidnih radikala koji dalje uzrokuju lančane reakcije razgradnje nanočestica. Fizičku stabilnost lipidnih nanočestica moguće je poboljšati modifikacijom površine čime se može izbjeći proces agregacije čestica. Važno je da modifikacija površine ne utječe na farmakokinetiku dizajniranog sustava, biodistribuciju i cjelokupni mehanizam djelovanja. U nekim slučajevima, modificirani konjugat površinskog

materijala i nanosustava rezultira potpuno novim mehanizmom djelovanja i biološkim odgovorom koji ne bi bio primijećen kada bi te komponente promatrali zasebno. Drugi aspekt modifikacije površine je ciljano djelovanje lijeka prema točno određenom receptoru za kojeg terapijski nanosustav u slobodnom obliku nema nikakve prepoznatljive interakcije.

Shematski prikaz različitih lipidnih nanosustava prikazan je Slikom 1.



**Slika 1.** Usporedni grafički prikaz presjeka građe micela, liposoma, nanoemulzija i čvrstih lipidnih nanosustava (SLN/NLC) (16)

### 1.2.1 Čvrste lipidne nanočestice

Čvrsti lipidni nanosustavi se klasificiraju kao :

- i) čvrste lipidne nanočestice (engl. *Solid Lipid Nanoparticles*, SLN),
- ii) lipid-lijek konjugati (engl. *Lipid Drug Conjugate*, LDC) i
- iii) nanostrukturirani lipidni nosači (engl. *Nanostructured Lipid Carrier*, NLC)
- iv) hibridne polimerno-lipidne nanočestice (engl. *Polymer-Lipid Hybrid Nanoparticle*, PLN) (21, 22).

Istraživanja čvrstih lipidnih nanočestica (SLN) kao nosača djelatnih tvari započela su 90-tih godina prošlog stoljeća kao alternativa polimernim nanočesticama, liposomima i lipidnim emulzijama. Tekuće lipidne ili uljne emulzije su se jedno vrijeme intenzivno koristile kao



prikladni farmaceutski oblici na što ukazuju mnoge komercijalno dostupne formulacije (Diazepam-Lipuro<sup>®</sup>, Braun; Sandimmun Neoral<sup>®</sup>/Optoral<sup>®</sup>, Novartis), no nedovoljna topljivost lijeka u uljnoj komponenti pokazala se s vremenom ograničavajućim parametrom. Alternativa tome bila je potraga za novim sirovinama (vrstama ulja) koje bi povećale topljivost lijeka, no za farmaceutsku industriju to je još uvijek dugotrajan i skup postupak zbog potrebnih toksikoloških studija (17). Slična situacija dogodila se s polimernim nanočesticama; pokazale su se neprikladnim zbog toga što se polimerni materijali vrlo lako mogu akumulirati u stanicama te dovesti do citotoksičnog efekta. Stoga su lipidne nanočestice nastale kao hibrid spomenutih terapijskih nanosustava. Prva saznanja o mehanizmu djelovanja koloidnih lipidnih nanočestica kao nosača lijekova objavljena su preglednim radom 1993., a jednim od pionira u ovom području smatra se njemački znanstvenik Rainer H. Müller (18). Lipidne nanočestice su veličine 50 - 1000 nm građene od čvrste hidrofobne jezgre okružene monoslojem surfakanta koji stabilizira cijeli sustav (19). Neke od važnijih prednosti lipidnih nanočestica su (20):

- i) produljeno ili odgođeno oslobađanje uklopljenog lijeka (djelatne tvari),
- ii) bolja fizička stabilnost u usporedbi sa liposomima,
- iii) niska toksičnost s obzirom da je matriks načinjen od fiziološki prihvatljivih lipida,
- iv) izbjegavanje upotrebe organskih otapala u proizvodnji,
- v) lakša validacija sustava i proizvodnog procesa.

Nedostaci lipidnih nanočestica kao terapijskih nanosustava su:

- i) niski kapacitet uklapanja lijeka (djelatne tvari),
- ii) istiskivanje (ekspulzija) lijeka iz čestica tijekom uskladištenja uslijed polimorfnih prijelaza lipida,
- iii) visok sadržaj vode (70 – 99,9%) u disperziji nanočestica otežava daljnju obradu, a da se ne ugrozi stabilnost sustava.

Nanostrukturirani lipidni nosači (NLC) su lipidne nanočestice koje se sastoje od smjese čvrstih i tekućih lipida čime nastaju nesavršene kristalne strukture lipida između kojih se uklapaju molekule lijeka. Prednosti NLC-a u odnosu na SLN su bolja (veća) efikasnost uklapanja lijeka te bolja fizička stabilnost tijekom skladištenja time što je spriječeno istiskivanje lijeka

karakteristično za SLN. Lijek-lipid konjugati (LDC) su nanočestice nastale direktnim vezanjem lipidnih molekula s molekulama lijeka bilo formiranjem soli ili kovalentnom vezom, odnosno procesom esterifikacije. LDC čestice mogu se nazvati i pro-lijekom koji nakon *in vivo* primjene oslobađa aktivni metabolit odnosno slobodni lijek (24). Polimer-lipid hibridne nanočestice (PLN) su trenutno najnovija generacija lipidnih nanočestica (22) nastale kao alternativa SLN-u za lijekove koji su terapijski učinkoviti u obliku soli. Naime, zbog prisutnosti naboja, koncentracija lijeka koji se može ugraditi u SLN čestice je dosta niska. Zato se kompleksi s polimerima suprotnog naboja čine kao prikladniji izbor. Možemo zaključiti da je ovisno o fizikalno-kemijskim svojstvima lijeka potrebno odabrati prikladan oblik modela lipidnih nanočestica. Općenito hidrofilnim molekulama pogoduje model LDC nosača dok lipofilnim molekulama odgovara SLN kao modelni nosači (21).

### *Lipidne komponente*

Odabir lipidnih komponenti ključan je dio razvoja čvrstih lipidnih nanočestica jer čini najveći udio u formulaciji. Fizikalno kemijske karakteristike lipida kao materijala imaju utjecaj na učinkovitost (uspješnost) uklapanja lijeka (engl. *encapsulation efficiency*, EE) (26, 31), stabilnost disperzije i mehanizam produljenog oslobađanja lijeka iz lipidnog matriksa (58). U literaturi se spominje više oblika lipidnih materijala pogodnih za formulaciju SLN-a kao što su slobodne masne kiseline, (tri)gliceridi, ulja i voskovi (Tablica 2). Većina materijala ima tzv. GRAS status (engl. *generally-recognized-as-safe*, GRAS), dodijeljen od FDA za tvari koje su sigurne za uporabu u hrani i lijekovima.

Odabir lipidnih komponenti u proizvodnji lipidnih nanočestica prije svega ovisi o topljivosti djelatne tvari u lipidima. Što je topljivost veća, veća je efikasnost uklapanja molekula lijeka tijekom procesa kristalizacije lipida i formiranja SLN-a. Topljivost lijeka u lipidima može se odrediti metodama UV-Vis spektroskopije ili prikladnim kromatografskim metodama ili na temelju koeficijenta razdjeljenja lijeka između uljne i vodene faze. Potrebno je napraviti probir između više lipidnih materijala kako bi se odredio najprikladniji sastav lipida za ciljani model lijeka (31, 46).

**Tablica 2.** Pregled najčešće korištenih lipida za pripravu čvrstih lipidnih nanočestica (prilagođeno iz (24))

Vrsta lipida		Komercijalno ime	Literaturni navod
Masne kiseline	Palmitinska kiselina		34, 37
	Stearinska kiselina		
Monogliceridi	Gliceril monostearat	Imwitor®900	25, 29, 31, 33, 36, 37, 52, 62
	Gliceril behenat	Compritol 888	23, 24, 25, 26, 28, 31, 33, 37, 43, 46, 54, 59, 61, 62
Digliceridi	Gliceril palmitostearat	Precirol® ATO 5	25, 27, 31, 33, 37, 48, 54
Trigliceridi	Gliceril tripalmitate/Tripalmitin	Dynasan 116	25, 28, 26, 57, 62
	Gliceril trimiristat/Trimiristin	Dynasan 114	23, 31, 37, 54, 57, 58
	Gliceril tristearat/Tristearin	Dynasan 118	25, 54, 57, 62
Tekući lipidi	Sojino ulje	Lipoid S100	33, 57, 58
Voskovi	Cetil palmitat		41, 53

Polimorfizam i kristalizacija lipida najvažnija su fizikalno kemijska svojstva koja utječu na efikasnost uklapanja lijeka u SLN-a i stabilnost same disperzije SLN-a (24). Lipidi u čvrstom stanju mogu postojati u više kristalnih formi. Postoje tri polimorfna oblika triglicerida poredanih prema termodinamičkoj stabilnosti:  $\beta > \beta' > \alpha$  forma. Manje stabilni polimorfni oblici posjeduju više kristalnih defekata unutar kojih se molekule lijeka mogu zarobiti tijekom procesa kristalizacije lipida u proizvodnom procesu. No to su ujedno i manje stabilne forme koje s vremenom teže prijelazu u stabilnije forme što može dovesti do istiskivanja lijeka iz nanočestica. Kristalizacija glicerida sa dužim alkalnim lancima je sporija što omogućuje ugradnju molekula lijeka u formirane kristalne defekte te veći kapacitet uklapanja lijeka (engl. *loading capacity*, LC) (21, 61, 62). Razlika u odnosu na efikasnost uklapanja je u tome što kapacitet punjenja predstavlja postotak ugrađene količine lijeka u odnosu na količinu lipida dok efikasnost

uklapanja izražava postotak lijeka ugrađenog u lipid u odnosu na količinu lijeka koja je dodana (31).

#### *Površinski aktivne tvari*

Površinski aktivne tvari (surfaktanti, engl. *surfactants*) su amfipatske molekule koje se sastoje od nepolarnog hidrofobnog dijela u obliku ravnog ili razgranatog lanca C-atoma koji su vezani za polarni ili hidrofilni dio. Ugljikovodični lanac (nepolarni dio) ima slabu interakciju sa molekulama vode dok polarna ili ionska skupina ima dobru interakciju sa molekulama vode ostvarujući ion-dipol veze. Pri niskim koncentracijama, surfaktanti se apsorbiraju na površinu sustava ili granicu između dviju faza, vodene i nevodene, odnosno uljne faze. Prema vrsti hidrofilnog dijela mogu se podijeliti na ionske (anionske i kationske), neionske i amfoterne. Prema funkciji u sustavu surfaktanti mogu biti osnovni i pomoćni. Karakterizira ih hidrofilno-lipofilni broj (HLB), engl. *hydrophile-lipophile balance*) čija vrijednost  $\leq 10$  naglašava lipofilna svojstva dok  $\geq 10$  naglašava hidrofilna svojstva. U pripremi SLN-a imaju dvije važne uloge (24); omogućuju stvaranje disperzije taline lipida u vodenoj fazi tijekom proizvodnog postupka i stabiliziraju koloidnu disperziju SLN-a u vodi nakon hlađenja. Mehanizam smanjenja površinske napetosti koji nastaje njihovim djelovanjem, dovodi do formiranja disperzije otopljenog lijeka i lipida u vodenom mediju tokom proizvodnje SLN čestica. Njihova uloga kao stabilizatora SLN čestica u disperzijama je dvojaka. Ionski surfaktanti povećavaju elektrostatska odbijanja SLN čestica što onemogućuje njihove interakcije, nastanak polimorfних prijelaza i rekristalizaciju lipida koji dovode do formiranja strukture gela (59). Fosfolipidi i fosfatidilkolini su najpoznatiji amfoterni surfaktanti koji se koriste u pripravi SLN sustava i prevladavaju u oralnim i parenteralnim pripravcima jer su manje toksični. Također, o odabiru surfaktanta ovisi i interakcija SLN-a s krvnim stanicama ili proteinima plazme (21). Već je pokazano da SLN koje sadrže Tween 80 ili poloksamer 188 kao stabilizatore pokazuju nizak afinitet vezanja na eritrocite ( $<10\%$ ) dok upotrebom Span 85 afinitet vezanja na eritrocite iznosi 75,3% (21).

**Tablica 3.** Najčešće korišteni surfaktanti (površinske aktivne tvari) u pripravi lipidnih nanočestica (prilagođeno iz (24))

Surfaktanti vrsta		Komercijalno ime	Literaturni navod
Ionski	Natrijev kolat		34
	Natrijev glikolat		58
Amfoterni	Fosfatidilkolin iz soje	Lipoid S 100, Lipoid S 75	23, 34, 44, 57, 58, 61
	Poliglicerolmetilglukoza distearat	TEGO® Care 450	28, 55
	Hidrogenizirani fosfatidilkolin iz soje	Phospholipon® 80H	25
Neionski	polioksietilen sorbitan monolaurat (Polisorbat 20)	Tween 20	31, 54
	polioksietilen sorbitan oleat (Polisorbat 80)	Tween 80	33, 37, 41, 48, 53, 54
	Polioksietilen-polioksiipropilen polimer	Pluronic® F68 Poloxamer 188	23, 34, 44, 54, 59, 61, 62
	Polietilen glikol	Poloksamer 124	33,
	Polietilen glikol-polipropilen glikol – polietilen glikol polimer	Pluronic® F-127 Poloksamer 188	46, 62

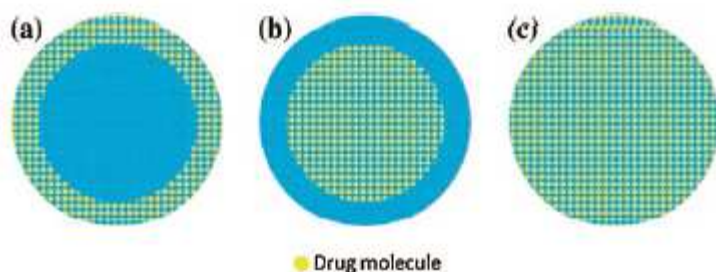
### 1.2.2 Vrste čvrstih lipidnih nanočestica

Ovisno o mjestu uklapanja lijeka unutar SLN-a (Slika 2), koje se postiže odgovarajućom metodom pripreme klasificirani su sljedeći oblici:

- spremišni tip SLN-a s lijekom uklopljenim u ovojnicu (engl. *drug-enriched shell model*)
- spremišni tip s lijekom uklopljenim u jezgri (engl. *drug-enriched core model*), te
- homogeni matriksni sustav (engl. *homogenous matrix model*) (17).

Spremišni tip SLN-a s lijekom uklopljenim u ovojnicu postiže se brzim hlađenjem otopljene lipidne komponente i lijeka nakon vruće homogenizacije, pri čemu se lipidna komponenta koncentrira u jezgri SLN-a i pritom istiskuje lijek koji se uklapa u ovojnicu. Ovaj model koristi se

za formulacije čiji je cilj postići trenutno oslobađanje lijeka iz SLN sustava. Spremišni tip sa lijekom uklopljenim u jezgri postiže se kada lijek kristalizira brže od lipidne komponente pri čemu se dešava obrnuti proces; lijek se koncentrira u jezgri dok istiskuje lipidnu komponentu koja formira ovojnicu. Ovaj model prikladan je za terapijske nanosustave s produljenim oslobađanjem lijeka prema Fick-ovom zakonu difuzije (24). Homogeni matriksni sustav sadrži lijek homogeno dispergirani kroz cijeli lipidni matriks te je također prikladan za formulacije s produljenim oslobađanjem lijeka.



**Slika 2.** Grafički prikaz različitih tipova SLN-a (24)

*Spremišni tip s lijekom uklopljenim u ovojnicu (drug-enriched shell model)*

Ovaj model predstavlja lipidna jezgra obavijena vanjskom ljuskom u kojoj se nalazi otopljeni lijek. Brzim hlađenjem vruće otopine lijeka i lipida formiraju se SLN čestice prikazane strukture, što se može objasniti s dva mehanizma koja se događaju istovremeno; lipid se taloži u središtu, dok se lijek istodobno odvaja od lipidne faze i lagano kreće prema granici faza s obzirom da je njegova topljivost veća u otopini gdje se nalazi i surfaktant. Budući da se topljivost naglo smanjuje kako se otopina hladi dolazi do koncentracije lijeka u obliku ljuske koja obavija lipidnu jezgru. Ovaj model SLN sustava pogodan je za formulacije lijekova koje omogućuju trenutno oslobađanje lijeka iz sustava (24, 31, 46).

### *Spremišni tip sa lijekom uklopljenim u jezgri (drug-enriched core model)*

Kada je mehanizam kristalizacije lipida sporiji od onog opisanog u prethodnom modelu SLN-a, formiraju se nanočestice u kojima je lijek uklopljen u jezgri, što znači da lijek ima tendenciju ranije kristalizacije u odnosu na lipide. Naime, kada se lijek nađe u talini lipida nastaje zasićena otopina koja se tokom hlađenja može pretvoriti u prezasićenu otopinu koja dovodi do brže kristalizacije lijeka od samog lipida. Ovaj model pogodan je za formulacije produljenog oslobađanja lijeka. Spremišni tipovi SLN sustava poznati su i pod nazivom *core-shell* modeli (34).

### *Homogeni matriksni sustav (solid solution model)*

Za razliku od prethodna dva tipa u kojima se lipidna komponenta i lijek razdvajaju, homogeni matriksni SLN sustav sadrži lijek raspoređen kroz lipidni matriks u obliku manjih amorfnih nakupina. Ovaj model SLN-a postiže se metodama vruće ili hladne homogenizacije te je pogodniji za izrazito lipofilne lijekove koji se mogu otapati bez prisustva surfaktanta. Lijek se otapa u lipidu nakon čega se formira homogeni matriks djelovanjem mehaničkih sila u uvjetima visokog tlaka. Za razliku od prethodna dva modela, ne dolazi do razdvajanja lijeka od lipida tokom hlađenja. Ovom modelu SLN-a pogoduju metode pripreme bez upotrebe surfaktanta. Ovaj tip SLN-a je pogodan za formulacije produljenog oslobađanja (24, 25, 42). Primjer modela homogenog matriksnog sustava opisanog u literaturi je formulacija risperidon SLN-a. Profil oslobađanja risperidona ukazuje na produljeno oslobađanje lijeka jer su molekule risperidona homogeno raspoređene kroz cijeli lipidni matriks (25).

### **1.2.3 Metode pripreme SLN-a**

Odabir metode pripreme SLN sustava ovisi prvenstveno o fizikalno-kemijskim karakteristikama lijeka kao što su termolabilnost, topljivost lijeka u lipidima, ciljanoj veličini čestica te stabilnosti vodene disperzije SLN sustava. Princip svih metoda pripreme temelji se na dvije kritične faze, a to su nastanak emulzije i disperzija čestica u vodi kako bi se omogućila kristalizacija lipida i/ili lijeka. Sve metode pripreme podrazumijevaju pripremu stabilne disperzije SLN sustava koja se daljnjom obradom različitim tehnikama sušenja, kao što su sušenje raspršivanjem ili

zamrzavanjem, može prevesti u suhi prašak (17, 26). SLN sustavi u obliku suhog praška mogu se dalje obraditi konvencionalnim proizvodnim postupcima u konačni i željeni farmaceutski oblik (suspenzije, tablete, kapsule, injekcije, itd.).

Metode pripreme SLN sustava mogu se razvrstati u:

- a) disperzijske (vruća i hladna homogenizacija, homogenizacija miješanjem),
- b) emulzijske (dvostruka mikroemulzija, obična mikroemulzija s ili bez mikrovalova), te
- c) metode na bazi otapala (difuzija, injektiranje ili isparavanje otapala).

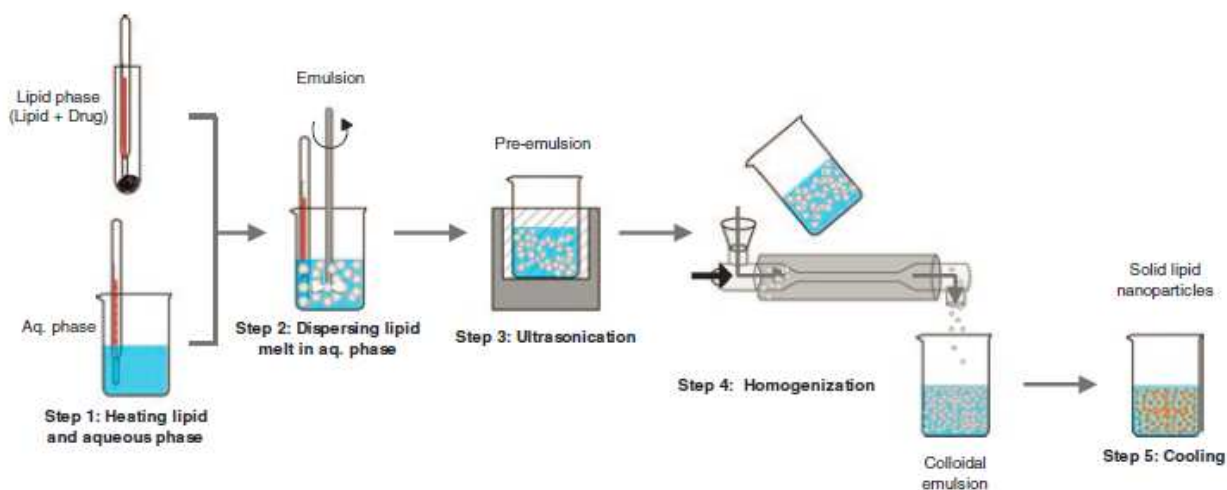
*Visokotlačna homogenizacija* je patentirana metoda pripreme lipidnih nanočestica koju su razvili Müller i Lucks (27). Ta se metoda koristi u proizvodnji emulzija lipida za parenteralnu prehranu zbog čega je regulatorno prihvatljiv postupak s aspekta Dobre proizvođačke prakse (engl. *good manufacturing practice*, GMP) i validacije. Korištenjem ove metode moguće je bez većih poteškoća osigurati reproducibilnost proizvodnog procesa prijelazom iz laboratorijskih na kliničke i/ili komercijalne veličine serija (28). Poznata su dva pristupa u primjeni visokotlačne homogenizacije; vruća i hladna homogenizacija. U oba pristupa lijek se otapa u lipidnoj komponenti na temperaturi višoj od točke tališta lipida (za otprilike 5–10 °C), nakon čega slijedi faza homogenizacije pri visokim tlakom te kristalizacija lipidnih nanočestica u vodenom mediju.

#### *Vruća homogenizacija*

Standardne metode pripreme emulzija masti za parenteralnu prehranu mogu se koristiti i za pripremu SLN sustava jednostavnom zamjenom tekućih lipida s onim u čvrstom stanju. Kao što samo ime kaže, proces se odvija na visokim temperaturama tj. onima iznad točke tališta lipida. Lijek se otapa u lipidnoj komponenti koja je u formi taline te se nastala talina dispergira u vodenoj otopini surfaktanta pri visokoj temperaturi i brzini miješanja. Time se dobiva primarna emulzija koje se u fazi ultrasoniciranja pretvara u pre-emulziju kako bi se dodatno smanjila veličina kapljica taline lijek-lipid na raspon od nekoliko mikrometara. Dobivena pre-emulzija se homogenizira pod visokim tlakom korištenjem prikladnog tipa homogenizatora (engl. *piston-gap* ili *jet-stream*). Nastala nanoemulzija hladi se na sobnu temperaturu što dovodi do kristalizacije taline lipid-lijek i nastanka koloidne disperzije SLN sustava. Faza homogenizacije može se ponavljati određeni broj puta kako bi se postigla što manja veličina dispergiranih čestica. U



pravilu 3-5 ciklusa homogenizacije je optimalna mjera, jer bi u protivnom moglo rezultirati koalescencijom kapljica odnosno spajanjem u veće kapljice te razdvajanjem faza (15). Veličina čestica se može dodatno smanjiti povećanjem tlaka i temperature prilikom homogenizacije, kontrolom vremena homogenizacije ili povećanjem omjera surfaktanta naspram lipida. Prosječna veličina SLN-a dobivenih ovom metodom priprave je 50 do 400 nm (43, 45, 62, 65). Vruća homogenizacija prikladna je metoda priprave za lijekove koji se mogu izlagati visokim temperaturama u kraćem vremenu. U slučaju da je lijek izrazito termolabilan, pogodnija je metoda priprave hladnom homogenizacijom. Na Slici 3 prikazan je shematski prikaz priprave vrućom homogenizacijom.

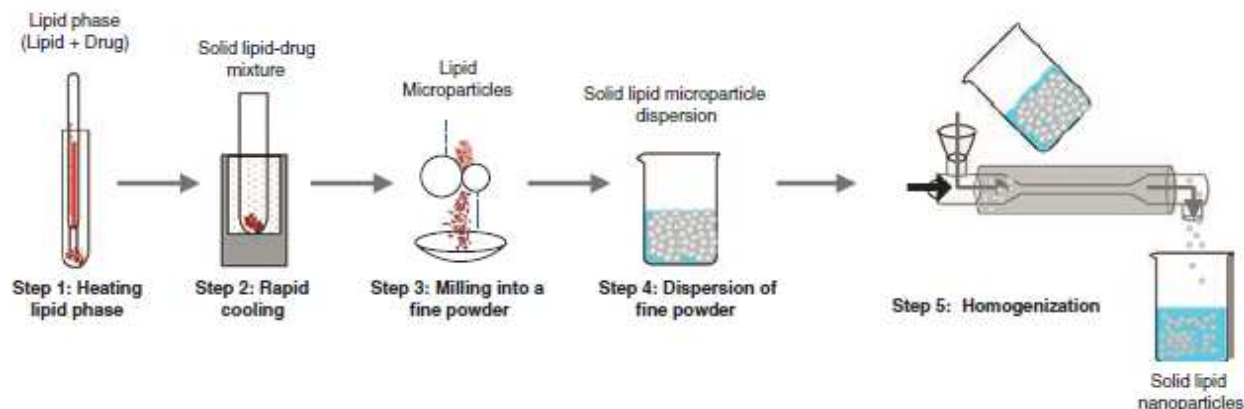


**Slika 3.** Shematski prikaz metode priprave SLN disperzije vrućom homogenizacijom (24)

Kritična faza priprave SLN-a je homogenizacija pri visokim tlakom jer ona utječe na veličinu nasatilih nanočestica. Prijenosom proizvodnog postupka iz laboratorijske veličine serije na kliničke ili komercijalne veličine serije, može se postići i manja veličina čestica pogotovo ako se spoji više homogenizatora u seriju (25). Reproducibilnost samog proizvodnog postupka postignuta je na retinolu kao modelnoj aktivnoj tvari. Varijabilnost srednje vrijednosti promjera čestica između proizvedenih serija bila je manja od 10 nm dok je tlak od 300-500 bara imao jako mali utjecaj na veličinu čestica (28).

### *Hladna homogenizacija*

Za razliku od vruće homogenizacije, SLN čestice mogu se pripremiti i visokotlačnom homogenizacijom na temperaturama nižim od točke tališta lipidne komponente. Prvi korak pripreme je isti kao kod vruće homogenizacije, otapanje lijeka u talini lipidne komponente. No idući koraci se značajno razlikuju i pogoduju nastanku homogenog matriksnog sustava. Smanjenjem temperature uslijed naglog hlađenja, usporava se kristalizacija i lijeka i lipida čime se gotovo izjednačava brzina njihove kristalizacije. Prednosti primjene nižih temperatura prilikom homogenizacije su izbjegavanje degradacije SLN sustava, polimorfnih prijelaza lipida zbog kompleksnosti kristalizacije te stvaranje pothlađene taline (15, 23). Hladna homogenizacija prikladnija je za hidrofilne lijekove, koji se zbog koeficijenta razdjeljenja teže odvajanju u vodenoj fazi kojoj bivaju izloženi kod vruće homogenizacije neposredno nakon zagrijavanja s lipidima (15, 20). Kao i kod vruće homogenizacije, lipidni materijal u čvrstom obliku se zagrijava nakon čega se lijek ugrađuje u lipidni matriks otapanjem u talini lipida. Talina lipida i lijeka se hladi u kratkom vremenu korištenjem suhog leda ili tekućeg dušika čime se postiže homogena distribucija lijeka unutar lipidnog matriksa te formiranje smjese u čvrstom stanju. Dobivena smjesa se melje u fini prašak sastavljen od lipidnih mikročestica. Dobivene mikročestice promjera u rasponu 50-100  $\mu\text{m}$  se dispergiraju u ohlađenoj otopini surfaktanta, koja se zatim homogenizira pri visokom tlaku i sobnoj temperaturi kako bi se postigao homogeni matriks (Slika 4). Optimalni broj ciklusa homogenizacije je 5 pri tlaku od 500 bara (21), no također se mogu primijeniti uvjeti od 10 ciklusa pri 1500 bara (44). Sile potrebne da se čestice razbiju u nanometarsku veličinu su znatno veće jer se radi o česticama u čvrstom stanju. Stoga ovaj proizvodni postupak zahtjeva veći unos energije u odnosu na vruću homogenizaciju. Kako bi se izbjegao gubitak hidrofilnog lijeka u vodenoj fazi, ona se može zamijeniti s uljima ili polietilenglikolom (17).

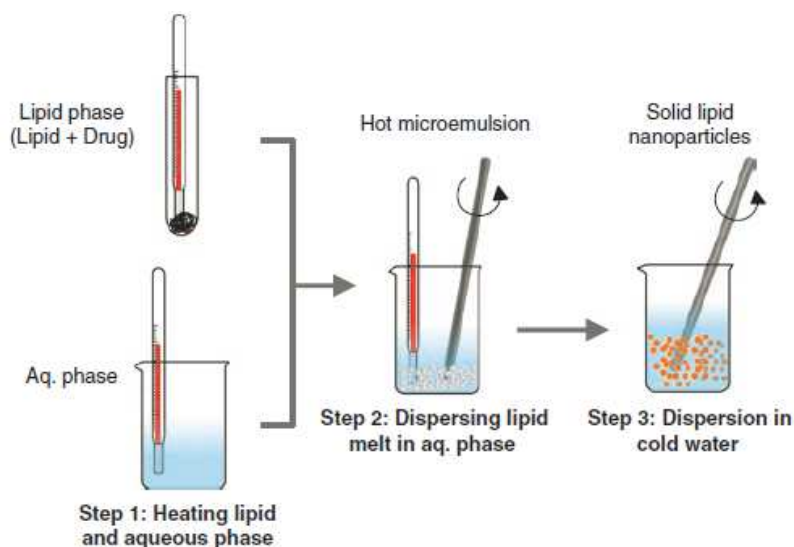


**Slika 4.** Shematski prikaz metode priprave SLN disperzije hladnom homogenizacijom (24)

### *Mikroemulzijska metoda*

Mikroemulzije su gotovo prozirne disperzije koje se sastoje od lipofilne faze, osnovnih i pomoćnih surfaktanata i vode. Njihova karakteristika je da istodobno pokazuju svojstva emulzija i otopina. Možemo reći da je lijek dijelom otopljen u mikroemulziji odnosno lipidnim sferama nanometarskih dimenzija. Proizvodni postupak priprave SLN čestica taloženjem iz mikroemulzije opisali su Gasco i sur. (29, 30). Mikroemulzija lipida pripravlja se pri temperaturi višoj od temperature tališta lipida kroz dva paralelna koraka. Lipidna komponenta zagrijava se zajedno s lijekom (djelatnom tvari) kako bi se molekule lijeka otopile u lipidu. Na istu temperaturu (talište lipida) zagrijava se vodena otopina osnovnih i pomoćnih surfaktanata. Talina lipida i lijeka se zatim uz lagano i kontinuirano miješanje dodaje vodenoj otopini surfaktanta pri čemu nastaje mikroemulzija koja se kasnije disperzira u hladnom vodenom mediju (2-10°C) uz lagano miješanje kako bi osiguralo da veličina čestica nastaje isključivo procesom taloženja (Slika 5). Dobivena disperzija se može dodatno filtrirati kako bi se uklonio preostali sadržaj neotopljenog lijeka i lipida, zatim sterilizirati upotrebom autoklava ili liofilizatora (30). Nastale čestice nazivaju se još i lipidne nanosfere (29). Ključan korak je proces otapanja lijeka koji pak ovisi o sastavu lipidne komponente. Za pripravu mikroemulzija su pogodne smjese triglicerida ili masnih kiselina koji imaju niže točke tališta. Dobivene lipidne nanosfere prosječne su veličine 150 nm. Prednost mikroemulzije u usporedbi sa metodama priprave homogenizacijom je u tome da ne uključuje dodatne korake i unos energije kako bi se postigla nanometarska veličina čestica.

Tipični omjeri volumena mikroemulzije i vode su 1:25 i 1:50. Može se dodatno kombinirati s visokotlačnom homogenizacijom kako bi se postigla još manja veličina čestica (58).



**Slika 5.** Shematski prikaz metode pripreve SLN disperzije mikroemulzijskom tehnikom (24)

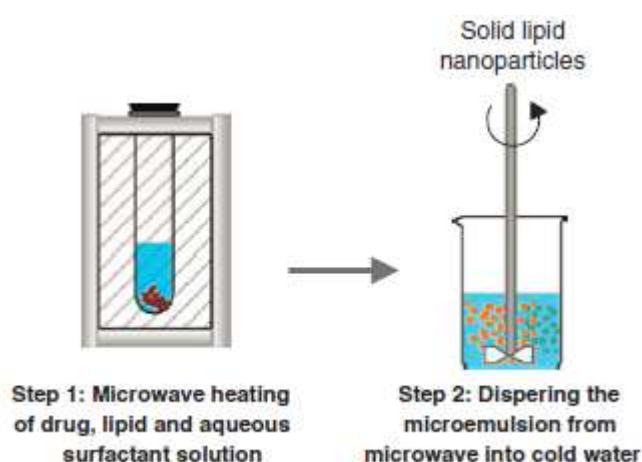
#### *Mikroemulzija potpomognuta mikrovalovima*

Autori ove metode su Shah i sur. (31) koji su odlučili primijeniti energiju mikrovalova kao izvor energije za zagrijavanje sustava umjesto konvencionalnih metoda zagrijavanja. Smjesa lijeka, lipida i vodena otopina osnovnih i pomoćnih surfaktanata izlažu se kontroliranom mikrovalnom zagrijavanju na temperaturu veću od temperature tališta lipida uz konstanto miješanje (Slika 6). Za razliku od prethodnih tehnika, sve komponente zagrijevaju se zajedno, u jednoj reakcijskoj posudi, što je svakako prednost i ušteda energije. Zagrijavanje reakcijskih posuda kod obične mikroemulzije uvelike ovisi o toplinskom kapacitetu materijala od kojeg je posuda napravljena što produžuje postupak dok mikrovalovi direktno djeluju na sadržaj u posudama bez njihovog prethodnog zagrijavanja. Dobivena vruća mikroemulzija se hlađenjem dispergira u vodenoj otopini na temperaturi 2-4°C pri čemu se formiraju SLN čestice, kao kod mikroemulzije. Autori su pokazali prednosti ove tehnike na temelju usporedbe pojedinih fizikalno kemijskih svojstava naspram SLN čestica proizvedenih običnom mikroemulzijom. Kao modelni lijek korišten je tetraciklin a sažetak rezultata je prikazan u Tablici 4.

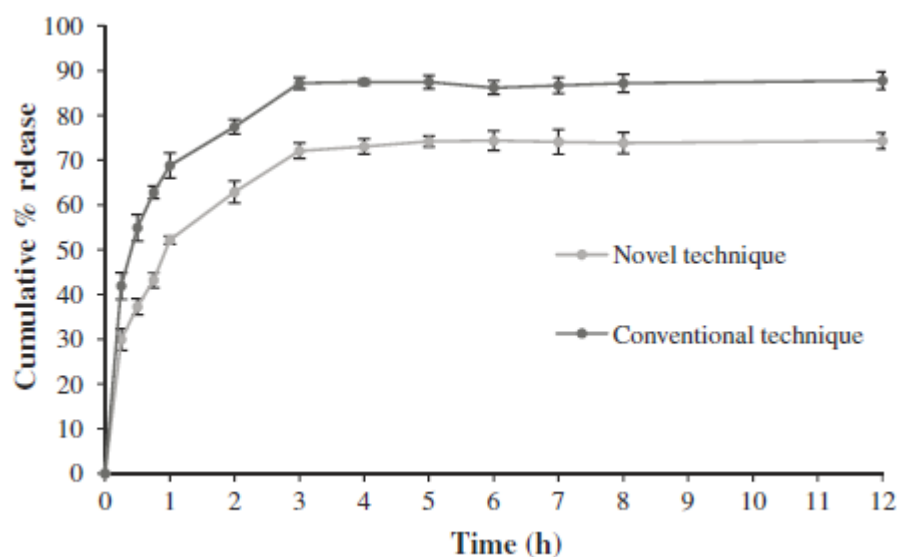
**Tablica 4.** Fizikalna svojstva SLN s tetraciklinom pripremljenih različitim mikroemulzijskim metodama (31)

Parametar	Mikroemulzijska metoda	Mikroemulzijska metoda potpomognuta mikrovalovima
Veličina čestica	350 – 600 nm	200 – 250 nm
Zeta potencijal	- 23 mV do 28 mV	-20 mV do -25 mV
Uspješnost uklapanja (%)	15,9 (minimalno) 24,9 (maksimalno)	47,5 (minimalno) 50,4 (maksimalno)
Kapacitet uklapanja (%)	1,2 (minimalno) 2,4 (maksimalno)	2,5 (minimalno) 7,1 (maksimalno)

Primjenom mikrovalova kao izvora energije u postupku mikroemulzije postižu se čestice značajno manjih veličina. Slični rezultati pokazani su na SLN česticama korištenjem lijeka u obliku soli mikonazol i ekonazol nitrata (32). Dobivene su čestice manje veličine nego običnom mikroemulzijskom tehnikom, visoke efikasnosti uklapanja, kapaciteta i niske kristaliničnosti lipidnog materijala. Ova metoda je izrazito pogodna za formulacije produljenog oslobađanja lijeka jer dobivene SLN odgovaraju spremišnim *core-shell* tipovima ovisno o tome da li će prvo nastupiti kristalizacija lijeka ili lipidne komponente. To potvrđuju i usporedni profili oslobađanja tetraciklina prikazani na Slici 7 (31). Veličina čestica koja se može postići ovom metodom kreće se u rasponu od 200-250 nm.



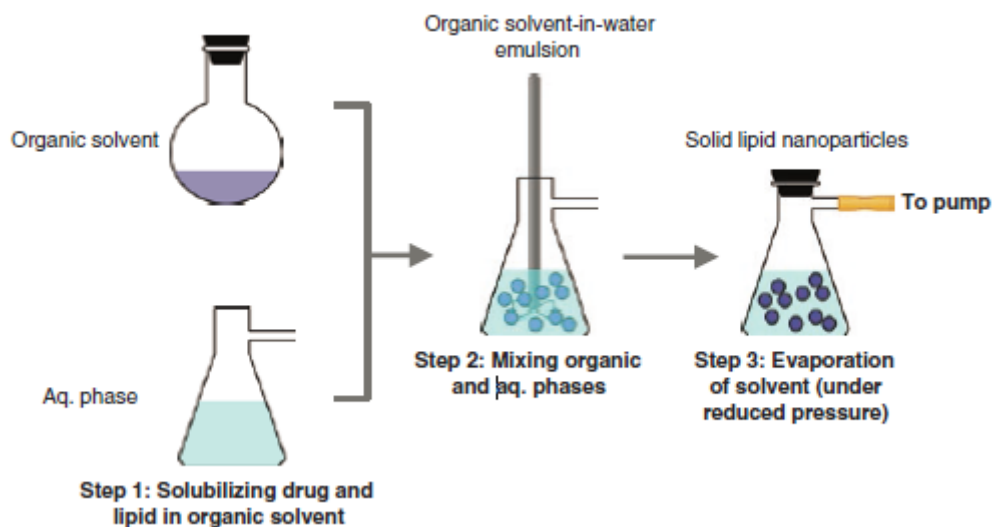
**Slika 6.** Shematski prikaz metode pripreme SLN disperzije tehnikom mikroemulzije potpomognute mikrovalovima (24)



**Slika 7.** Usporedni profili oslobađanja tetraciklina iz SLN čestica proizvedenih konvencionalnom tehnikom mikroemulzije i metodom mikroemulzije potpomognute mikrovalovima u fosfatnom puferu (PBS, pH 7.4) pri 37°C (31).

#### *Priprava SLN čestica metodom uklanjanja (otparavanja) organskog otapala*

Metoda uklanjanja organskog otapala je konvencionalna metoda priprave SLN-a i jedna od ranije poznatih u literaturi. Čvrsti lipid ili smjesa lipida se otapa u organskom otapalu zajedno sa lijekom. Pri tome nastaje mikroemulzija organskog otapala i vode koja se pretvara u disperziju nastalih SLN čestica zbog isparavanja organskog otapala pri sniženim tlakom (Slika 8). Često korištena otapala su cikloheksan, kloroform i etil acetat. Nedostatak ove metode je upotreba štetnih organskog otapala i njegovi potencijalni ostaci u samoj disperziji, te zagrijavanje sustava koji može uzrokovati degradaciju (20).

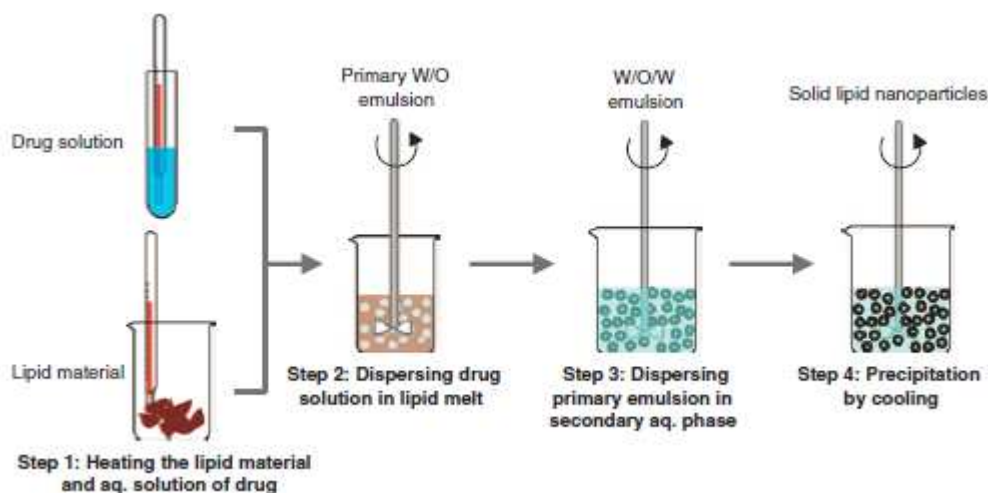


**Slika 8.** Shematski prikaz metode priprave SLN disperzije metodom otparavanja organskog otapala (24)

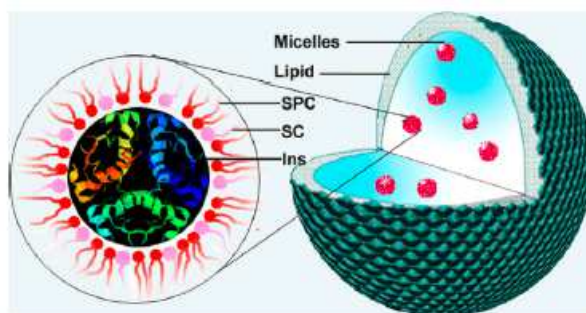
### *Metoda dvostruke emulzije*

Ova metoda nastala je kao nadogradnja metode uklanjanja organskog otapala pripremom zasebne emulzije vodene otopine lijeka u organskom otapalu u kojem je prethodno otopljen lipid uz dodatak emulgatora. Pri tome nastaje, kao što i samo ime metode kaže, dvostruka emulzija. Kasnije je metoda razvijena na način da se iz upotrebe isključi organsko otapalo te se dvostruka emulzija priprema samo korištenjem vodenih otopina. Prvo se priprema emulzija vodene otopine lijeka u otopljenom lipidu ili tzv. primarna emulzija koja se stabilizira dodatkom želatine ili poloksamera. Novonastala primarna emulzija voda/ulje se disperzira u drugu vodenu otopinu koja sadrži stabilizator uz konstantno miješanje kako bi nastala dvostruka emulzija voda/ulje/voda. Kontinuiranim miješanjem dolazi do taloženja SLN čestica. Poznate su i kombinacije ove tehnike s tehnikom vruće homogenizacije ili homogenizacije potpomognute ultrazvukom kako bi se postigla bolja disperziranost u primarnoj emulziji (34) i korištenjem micela (Slika 10) kako bi se lijek što bolje rasporedio unutar SLN čestice i zaštitio od bilo kakvog utjecaja. Ostatak organskog otapala može se otkloniti korištenjem rotacijskog uparivača. Prednosti ove metode su postizanje visoke efikasnosti uklapanja lijeka u SLN sustav, čak do 97%, kapaciteta punjenja do 19% i prilično mala veličina čestica (~110 nm) ako uzmemo u obzir

da nikakva vrsta mehaničkih sila nije primijenjena kao u homogenizacijskim tehnikama (34). Ovom metodom postiže se spremišni tip SLN čestica s lijekom uklopljenim u jezgri pogodan za formulacije odgođenog oslobađanja lijeka iz sustava. Zbog toga što u metodi nema primjene snažnih rotacijskih sila ili povišene temperature također je prikladna za formulacije temperaturno-osjetljivih djelatnih tvari kao što su polipeptidi i proteini (33).



**Slika 9.** Shematski prikaz metode priprave SLN disperzije tehnikom dvostruke emulzije (24)



**Slika 10.** Shematski prikaz SLN-a koje sadrže inzulin zarobljen u obliku micela (34)

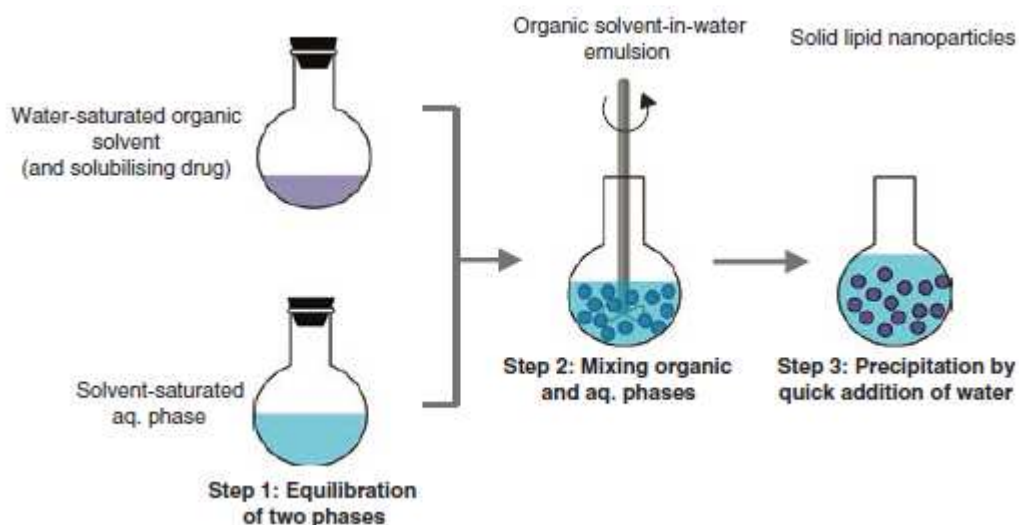
### *Metoda difuzije otapala*

Metoda difuzije otapala uvedena je u proizvodnju polimernih nanočestica od autora Leroux i sur. (35) iako je tehnika kao takva razvijena i patentirana već ranije (36). Prednosti metode su



izbjegavanje zagrijavanja sustava, ali najveći nedostatak je upotreba organskih otapala čiji bi odabir trebao zadovoljavati regulatorne zahtjeve po pitanju toksičnosti. Organska otapala koja se djelomično otapaju u vodi kao što su npr. benzilni alkohol, butil laktat, tetrahidrofuran i sl. mogu poslužiti kao otapalo lipida. Lipidna komponenta otapa se u zasićenoj vodenoj otopini organskog otapala u koju se zatim dodaje lijek (Slika 11). Organska otapala zasićuju se vodom jednako kao što se vodena faza zasićuje organskim otapalom kako bi se postigla termodinamička ravnoteža između ta dva sustava prije njihovog miješanja. Vodena faza služi kao emulgator prethodne otopine. Organska faza se zatim emulgira sa zasićenom vodenom otopinom koja sadrži. U nastaloj emulziji miješanjem i dodavanjem vode izdvajaju se SLN taloženjem jer organsko otapalo brzo difundira u vodenu fazu. S obzirom da isključuje upotrebu visokih koncentracija osnovnih i pomoćnih surfaktanta, ova tehnika je izrazito pogodna za pripremu SLN-a s produljenim oslobađanjem lijeka. Hu i suradnici (37) opisali su noviju tehniku difuzije otapala na modelu lipofilnog lijeka klobetazola s ciljem da razviju SLN s produljenim oslobađanjem lijeka bez upotrebe surfaktanta. Princip tehnike je da se lipidna komponenta (monostearin) i lijek otapaju u organskoj fazi (aceton i etanol) na vodenoj kupelji pri 50°C. Dobivena organska otopina se dodaje kiseloj vodenoj otopini (pH 1,10) koja sadrži 1% polivinil alkohola uz mehaničko miješanje pri čemu se stvara SLN suspenzija zbog brze difuzije organskih otapala u vodenu fazu. Ovom metodom proizvodnje dobivene su SLN čestice s bimodalnom distribucijom veličine čestica i bifaznim mehanizmom otpuštanja lijeka. U usporedbi sa standardnom metodom difuzije korištena je vodena faza izrazito kiselog pH 1,10 kako bi se potakla koacervacija i taloženje lipida za razliku od uobičajenog pH od 5,73 gdje se spomenute pojave nisu desile što se može zaključiti iz postotka iskorištenja SLN-a i dodanog lijeka. Nedostatak ove metode je što se ne mogu postići čestice manje od 200-400 nm (38).

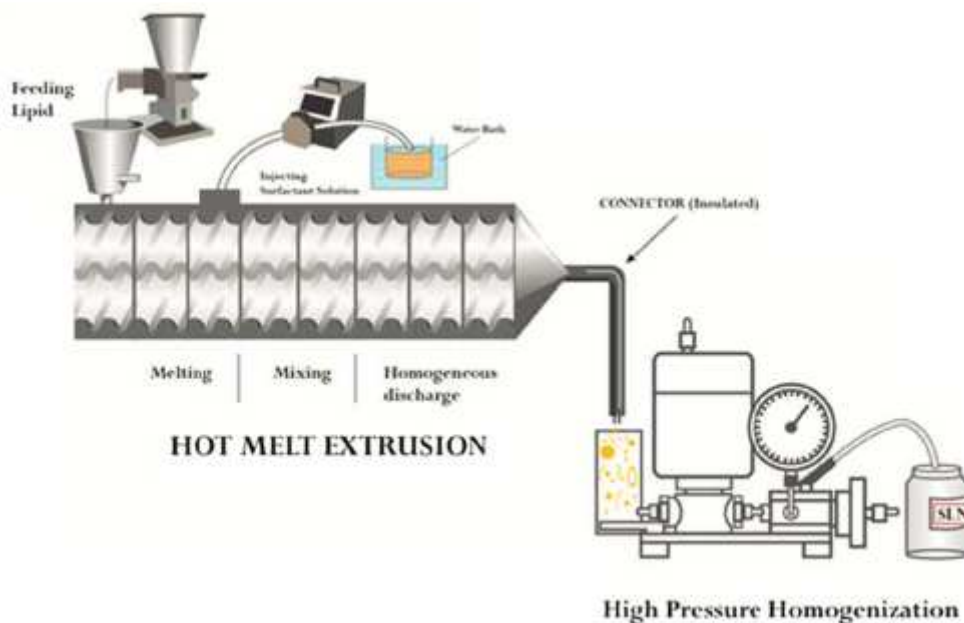
*Metoda injektiranja otapala* je također konvencionalna metoda pripreme koja je izvedenica iz metode difuzije otapala i učestalo se koristi u proizvodnji liposoma i polimernih nanočestica (24).



**Slika 11.** Shematski prikaz metode pripreve SLN disperzije difuzijom otapala (24)

#### *Metoda hot-melt ekstruzije u kombinaciji sa visoko tlačnom homogenizacijom*

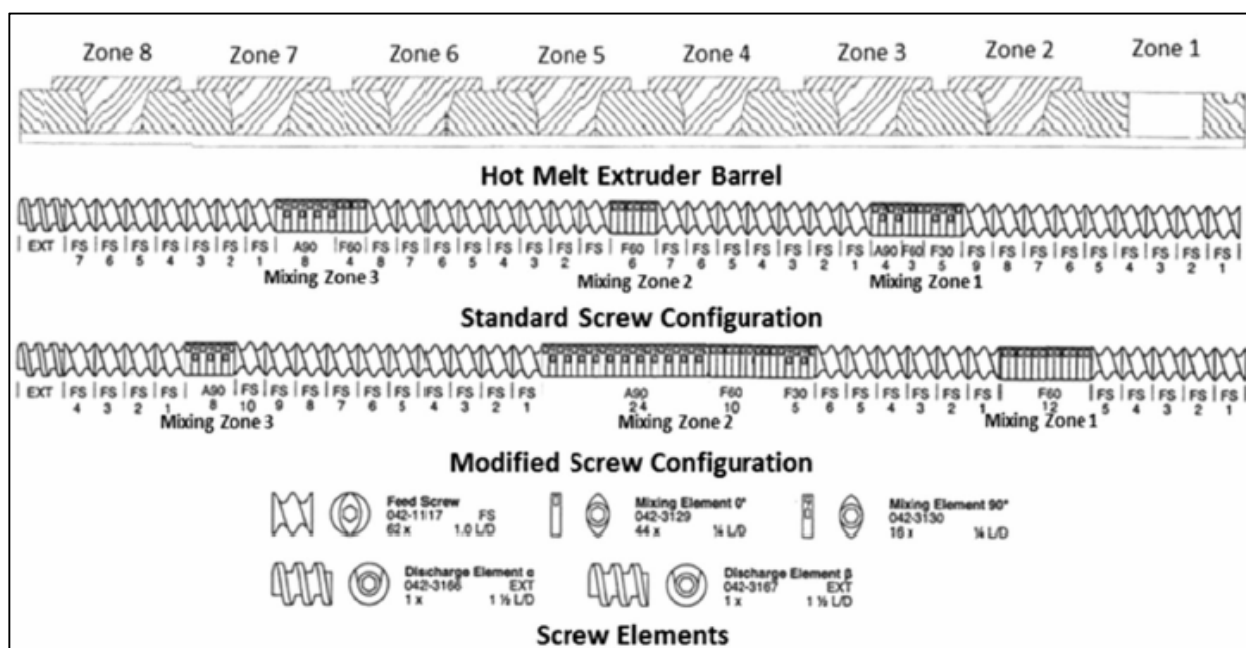
Hot-melt ekstruzija (engl. *hot-melt extrusion*, HME) je inovativna tehnologija u farmaceutskoj industriji iako je kemijskoj industriji poznata od 1930-tih u obradi polimernih materijala kao što su plastika i guma ili čak u prehrambenoj tehnologiji. Prednosti u odnosu na ostale konvencionalne proizvodne postupke su kraće vrijeme proizvodnje, veća iskoristivost polaznih materijala, mogućnost obrade polaznih materijala bez upotrebe otapala, lakoća povećanja na veće veličine serije od laboratorijskih te primjena u proizvodnji šireg spektra farmaceutskih oblika namijenjenih za oralnu i transdermalnu primjenu. HME tehnologija lako se može kombinirati sa drugim konvencionalnim proizvodnim postupcima. Primjerice, hot-melt ekstruder može se spojiti na visoko tlačni homogenizator (Slika 12) kako bi se postigla odgovarajuća veličina nanočestica (39).



**Slika 12** Shematski prikaz kombinacije proizvodnih metoda hot-melt ekstruzije i visokotlačne homogenizacije (39)

Kombinacija metoda HME-HPH prvi put je uspješno primijenjena u proizvodnji SLN-a s fenofibratom koji pripada BCS klasi II i praktički je netopljiv u vodi. U tom slučaju HME tehnologija zamjenjuje fazu pripreme disperzije ili emulzije taline lipid-lijek u vodenoj otopini prije unosa u visoko tlačni homogenizator. Ekstruder se sastoji od nastavka za unos lipida tzv. *feeding hooper*-a, ekstruzijske cijevi ili barela i rotirajućeg vijka koji se pruža kroz ekstruzijski barel. Vanjska elektronska kontrolna jedinica može se spojiti na ekstruder kako bi se optimizirala brzina okretaja rotirajućeg vijka, temperature, tlaka i brzine unosa polaznih materijala. Konfiguracija rotirajućeg vijka može biti standardna i promjenjiva, ovisno o primjeni metoda. Ekstruzijski barel sastoji se od više zona u kojima se može odvijati miješanje i raspodjela čvrstih polaznih materijala (lipida i lijeka), taljenje i crpljenje taline u iduću fazu obrade. Ekstruder se može sastojati i jednostrukog ili dvostrukog rotirajućeg vijka. Jednostruki vijci pronalaze svoju primjenu u obradi plastičnih materijala dok su dvostruki rotirajući vijci namijenjeni za obradu više vrsta materijala te nalaze primjenu u farmaceutskoj industriji kao i u proizvodnji SLN čestica. Rotirajući vijci sastoje se od više modularnih zona od kojih svaka ima svoju ulogu u procesu (Slika 13) bilo da se radi o miješanju, taljenju ili otpuštanju finalnog materijala. Dvostruki rotirajući vijak omogućuje bolje miješanje i disperziju čestica lipida i lijeka kako bi se

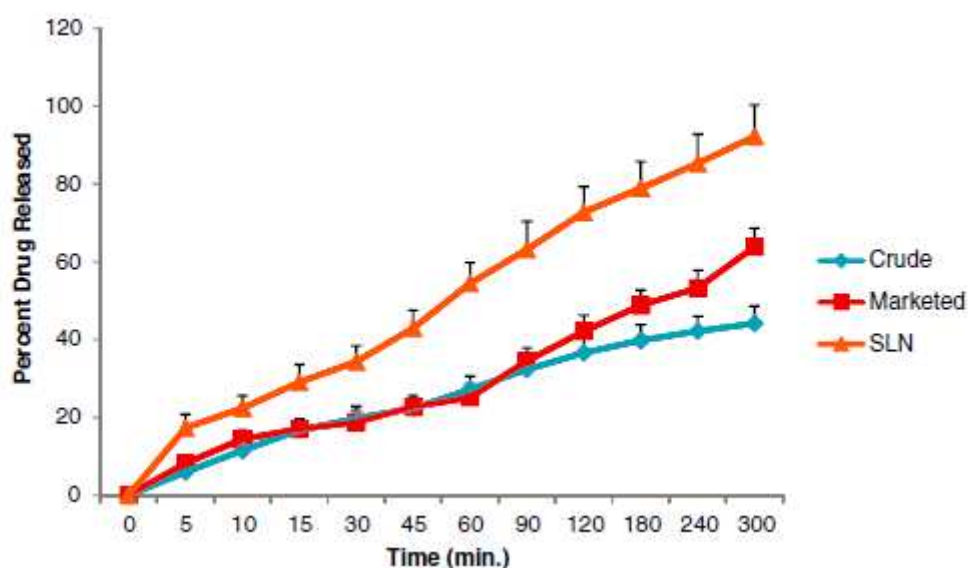
postigla što bolja distribucija čestica prije faze taljenja. Taljenje se postiže blagim zagrijavanjem stijenki ekstruzijskog barela dok se najveća količina energije potrebne za taljenje lipida postiže upravo okretanjem rotirajućih vijaka. Na ekstruzijski barel može se spojiti i dovod vodene otopine surfaktanta koji se spaja u zonama nakon nastanka taline. Jednostavnim konektorom, HME se spaja s visoko tlačnim homogenizatorom koji daljnjom obradom dobivene pred-emulzije omogućuje dobivanje čestica nanometarskih dimenzija (39).



**Slika 13** Shematski prikaz dvostrukog rotirajućeg vijaka i odgovarajućih zona u ekstruzijskom barelu (39)

Usporedbom veličine čestica sustava SLN-fenofibrat proizvedenih kombinacijom tehnologija HME-HPH (653 nm) i konvencionalnom metodom pripreme emulzije (1643 nm) može se zaključiti da će nova tehnologija zahtijevati manji broj ciklusa homogenizacije, odnosno manji utjecaj temperature i tlaka na SLN koji potencijalno mogu uzrokovati njihovu degradaciju ili naglo oslobađanje lijeka iz spremišnog sustava tijekom procesa proizvodnje. Uspješnost primjene kombinacije HME-HPH tehnologija u proizvodnji sustava SLN-fenofibrat dokazana je na temelju usporedbe profila oslobađanja lijeka proizvedenih konvencionalnim metodama proizvodnje (Slika 14). Upravo je otapanje/oslobađanje fenofibrata ograničavajući faktor njegovoj apsorpciji u sistemsku cirkulaciju. Prednost ove metode, kao i kombinacije tehnika sa HPH je mogućnost potpune automatizacije i optimizacije procesnih parametara kroz tzv. *single-*

*unit* mehanizam (40) te primjenu koncepta kontinuirane proizvodnje i procesne analitičke tehnologije odnosno koncepta kakvoće utemeljene kroz dizajn (engl. *Quality by Design*, QBD). Optimizacija procesnih parametara kod ove metode pripreve omogućuje obradu temperaturno-osjetljivih djelatnih tvari kao što su aminokiseline i proteini jer se primjenom raznih oblika rotirajućih sila unosi minimalna količina energije potrebna za obradu polaznih materijala (40).



**Slika 14.** Usporedni profili oslobađanja fenofibrata iz čvrstog oblika ljekovite tvari, mikroniziranih kapsula 200 mg Lofibra® i SLN (39)

Ostali oblici proizvodnih postupaka su sljedeći:

#### *Homogenizacija visokom brzinom smicanja uz primjenu ultrazvuka*

Princip ove metode pripreve uvelike je sličan visokotlačnoj homogenizaciji. Sadrži fazu pripreme pred-emulzije koja počinje zagrijavanjem lipida 5-10 °C iznad temperature tališta, otapanje lijeka u lipidnoj talini te dispergiranje novonastale taline u vodenoj otopini surfaktanta uz miješanje pri visokom broju smicanja (engl. *high shear*). Dobivene mikročestice, odnosno

kapljice taline, potrebno je smanjiti na nanometarsku veličinu primjenom određene sile. Kod visokotlačne homogenizacije radi se o silama uzrokovanim povećanim tlakom, dok se kod ove metode pripreme veličina čestica smanjuje primjenom ultrazvuka, odnosno procesom sonifikacije. Slijedi korak postupnog hlađenja ispod točke kristalizacije disperziranog lipida pri čemu nastaje SLN disperzija (48). Nedostaci ove metode su mogućnost kontaminacije emulzije s metalom i nestabilnost proizvedene SLN disperzije. Lipidna komponenta se otapa u djelomično polarnim otapalima ili u njihovim smjesama, dok se lijek otapa u organskoj fazi koja se brzo injektira u vodenu otopinu koja sadrži surfaktant. SLN se talože prilikom distribucije otapala u vodenoj fazi uslijed miješanja (24).

#### *Metoda upotrebe membranskog kontraktora*

Lipidna talina u kojoj je otopljen lijek uvodi se kroz pore membranskog kontraktora koje služe kao paralelne kapilare kroz koje talina treba proći. Prilikom prolaza taline, formiraju se kapljice taline u vodenoj fazi koja tangencijalno protiče površinom membrane (24).

*Tehnika koacervacije* je jedna od najčešće primijenjenih metoda u proizvodnji polimernih nanočestica. Poznata je kao jedna od metoda mikrokapsuliranja (41). Temelji se na separaciji otopine hidrofilnog polimera u dvije tekuće faze. Natrijeva sol masnih kiselina se dispergira u vodenoj otopini koja sadrži polimerni stabilizator te se zatim zagrijava preko „*Krafft*“ točke  $T_c$  (temperatura na kojoj je topljivost monomera dovoljna za formiranje micela) uz konstantno miješanje. Zatim se dodaje lijek otopljen u etanolu uz konstantno miješanje. Induciranje razdvajanja faza se postiže polaganim dodavanjem otopine za koacervaciju kako bi se postigla suspenzija koja daljnjim hlađenjem u vodenoj kupelji počinje taložiti SLN čestice koje kao sfere obuhvaćaju lijek.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog specijalističkog rada je analizirati glavne aspekte razvoja čvrstih terapijskih nanosustava temeljenih na lipidima, prvenstveno čvrste lipidne nanočestice (SLN) uključujući metode pripreme te problematiku regulatornih tijela u evaluaciji regulatornih aplikacija.

Definirane su sljedeće hipoteze koje su ispitane kroz ovaj specijalistički rad:

Hipoteza 1: Primjena SLN-a kao oblika terapijskog nanosustava temeljenog na lipidima, siguran je i efikasan način poboljšanja terapijske učinkovitosti postojećih formulacija lipofilnih lijekova i temelj razvoja novih oblika terapija kao (npr. genska terapija).

Hipoteza 2: SLN se mogu proizvesti primjenom više oblika konvencionalnih i novih metoda pripreme ovisno o obliku i karakteristikama djelatne tvari i lipidnih komponenti. Preduvjet za odabir metode pripreme je detaljna fizikalno kemijska karakterizacija i lijeka (djelatne tvari) i lipidnog materijala.

Hipoteza 3: Primjenom koncepta kontinuirane proizvodnje i QbD pristupa osigurava se ciljani profil kakvoće SLN-a s uklopljenim lijekom tijekom prijelaza iz razvojne u komercijalnu fazu proizvoda.

### 3. MATERIJALI I METODE

Pretraživanje literature za temu ovog rada rađen je prema ključnim riječima predmeta istraživanja (ključne riječi; *lipid, nano therapeutic, solid lipid nanoparticles, drug delivery*), istaknutim autorima na tom području (Muller, Lucks, Shah) i časopisima (*J Control Release, Adv. Drug Deliv. Rev., Int. J. Pharm.*). Pretraživani su od općih prema specijaliziranim člancima pri čemu su odabrani oni članci koji su relevantni za problematiku ovoga specijalističkog rada. Također su obuhvaćeni godišnji izvještaji i smjernice vodećih agencija kao što su Europska agencija za lijekove (EMA) i američka agencija za hranu i lijekove (FDA). Relevantni članci proučavani su na analitički i kritički način s obzirom na definiranje znanstvenog i/ili stručnog problema, istraživanje postojećih znanja (literaturni navodi), oblikovanje radne hipoteze, odabir metoda za ispitivanje hipoteze, prikaz i analizu rezultata te izvedene zaključke.

Pri proučavanju relevantnih članaka izdvojeni su najvažniji rezultati, rasprave i zaključci koji će biti prikazani ovim specijalističkim radom. Na temelju proučavanih članaka biti će izvedena vlastita razmatranja proučavane problematike koja će biti sastavni dio rasprave specijalističkog rada.



## 4. RASPRAVA

### 4.1 Prednosti formulacija temeljenih na čvrstim lipidnim nanočesticama

Oralni put primjene preferirani je način primjene lijekova iz mnogo razloga. Iako zahtijeva visoku suradljivost pacijenata u usporedbi sa intravenskom primjenom, nastanak infekcija i odsustvo boli prilikom primjene predstavljaju prednost. Kod dugotrajnog intravenskog liječenja mogu se pojaviti ozbiljni problemi kao što su ekstravazacija (izlazak tekućine u okolna tkiva) i infiltracija (nakupljanje tekućine u okolnom tkivu) što dovodi do prekida terapije. Stoga je za dugotrajne terapije svakako preferiran oralni put primjene lijeka. No izazovi s kojima se nose oralne formulacije su loša topljivost lijeka, loša gastrointestinalna apsorpcija, izražen metabolizam prvog prolaska kroz jetru, visoke varijacije koncentracije lijeka u krvnoj plazmi (42). Otprilike 40% lijekova koji se trenutno nalaze na tržištu je slabo topljivo u vodi, dok približno 90% molekula u fazi istraživanja pokazuje isto svojstvo. Terapijski nanosustavi pogodni su sustavi za uklapanje lijekova koji imaju izražena svojstva loše topljivosti i niske bioraspoloživosti. Sustav pruža zaštitu molekulama lijeka te ciljano dovodi lijek do mjesta djelovanja u nepromijenjenom obliku. Reformulacija postojećih lijekova slabe topljivosti i bioraspoloživosti korištenjem terapijskih nanosustava može uvelike poboljšati njihov terapijski indeks. SLN imaju veliku prednost u odnosu na ostale terapijske nanosustave. Fizikalno-kemijska raznolikost, stabilnost i biokompatibilnost lipida koji su glavna građevna jedinica SLN čestica, pridonose mehanizmima prolaska kroz razne barijere (43) dok je istodobno njihova citotoksičnost umanjena što je svakako važan aspekt u slučaju akumulacije čestica u zdravim tkivima. Karakterističan mehanizam endocitoze koji potiču SLN čestice dovode lijek direktno u oboljela tkiva što je važno otkriće i temelj za razvoj nove generacije tumorskih terapija, posebice malignih glioma s niskom stopom preživljavanja. U usporedbi s polimernim nanočesticama, SLN imaju prednost s toksikološkog aspekta. Razgradnjom polimera mogu nastati toksični metaboliti koji se akumuliraju u zdravim tkivima dok je razgradnja lipida prirodni proces koji se odvija u ljudskom organizmu. Liposomi su među prvim terapijskim nanosustavima temeljenim na lipidima prisutnim u kliničkoj praksi. Razvijen je niz uspješnih formulacija korištenjem liposoma kao što su Doxyl® i Caelyx® (liposomski doksorubicin), AmbiSome® i Abelect®

(liposomski amfotericin B). Glavni problem ovih formulacija je očuvanje njihove stabilnosti. Iz tog razloga se spomenuti gotovi pripravci često nalaze na FDA listi lijekova koje nedostaju na tržištu (tzv. *Drug Shortage List*).

SLN se mogu proizvesti jednostavnim metodama pripreme što je od velikog značaja za farmaceutsku industriju. SLN imaju čvrstu jezgru koja povećava fizikalno-kemijsku stabilnost cijelog sustava i pridonosi kemijskoj stabilnosti uklopljenog lijeka. Omogućeno je produženo oslobađanje lijeka, a modifikacijom površine nanočestica moguće je usmjeriti lijek na ciljano mjesto djelovanja.

Osiguranje stabilnosti važan je dio razvoja oralnih formulacija korištenjem terapijskih nanosustava temeljenih na lipidima. Kako bi definirali u kojim uvjetima osigurati stabilnost sustava, pored karakterizacije lijeka potrebno je detaljno proučiti i karakteristike lipida kao glavne građevne komponente. Polimorfizam lipida važan je aspekt koji utječe na stabilnost sustava jer ovisno o polimorfnom obliku lipida stvara se mjesto u sustavu za ugradnju lijeka. Savršene kristalne forme su termodinamički stabilnije no metastabilne forme su te koje osiguravaju prostor za uklapanje lijeka u lipidnu strukturu. S vremenom metastabilne forme mogu prijeći u stabilnije forme što uzrokuje naglo otpuštanje lijeka iz sustava. Stoga je potrebno u potpunosti karakterizirati mehanizam i uvjete u kojima dolazi do polimorfnih prijelaza lipida. Kao i kod liposoma, modifikacija površine lipidnih nanočestica može pridonijeti stabilnosti sustava no može i u potpunosti izmijeniti farmakokinetiku terapijskog nanosustava. Dodatkom hidrofilinih polimera kao što su polioksipropilenski kopolimeri, kitozan, polivinil alkohol i PEG postiže se isti učinak kao kod liposoma, a to je povećana bioraspoloživost odnosno produženo vrijeme polueliminacije i time efikasnija distribucija SLN-a u bolesnom tkivu (44). PEG-iliranje ima još veći učinak jer čini česticu neprepoznatljivom retikuloendotelnom sustavu (45). Osim specifičnih funkcionalnih grupa koje utječu na bioraspoloživost, SLN mogu vezati specifične ligande koji olakšavaju pronalazak bolesnog tkiva, odnosno stanica (19).

Važan aspekt fizikalno-kemijske karakterizacije SLN-a je kinetika oslobađanja lijeka iz sustava koja bi poslužila u uspostavljanju *in vitro in vivo* korelacija (skr. IVIVC). Već je spomenuto da su SLN nanosustavi izrazito pogodni za kontrolirano i produženo oslobađanje lijeka (46) no profil oslobađanja ovisi o mnogo kritičnih svojstava SLN-a, njenih komponenti i same metode

priprave. U poglavlju 1.2.3. je pokazano kako ovisno o odabiru metode priprave nastaje određeni model SLN-a. Možemo zaključiti da je detaljna fizikalno-kemijska karakterizacija SLN-a preduvjet za *in vivo* studije kao i za uspostavljanje korelacije s *in vitro* podacima. Terapijski nanosustavi su općenito bez obzira na vrstu i podrijetlo podložni degradaciji izazvanoj i najmanjim promjenama u njihovoj okolini. Pretpostavimo da je provedena detaljna fizikalno-kemijska karakterizacija SLN-a, postavlja se pitanje kako zadržati kritična svojstva unutar definiranih granica u uvjetima prijelaza iz laboratorijske na komercijalnu veličinu serije. Kao logičan izbor nameće se implementacija koncepta kakvoće utemeljene kroz dizajn (QbD). Sustavni pristup razvoju kroz razumijevanje procesa i proizvoda ubrzao bi vremenski razvojnu fazu proizvoda kao i fazu prijelaza u komercijalnu proizvodnju.

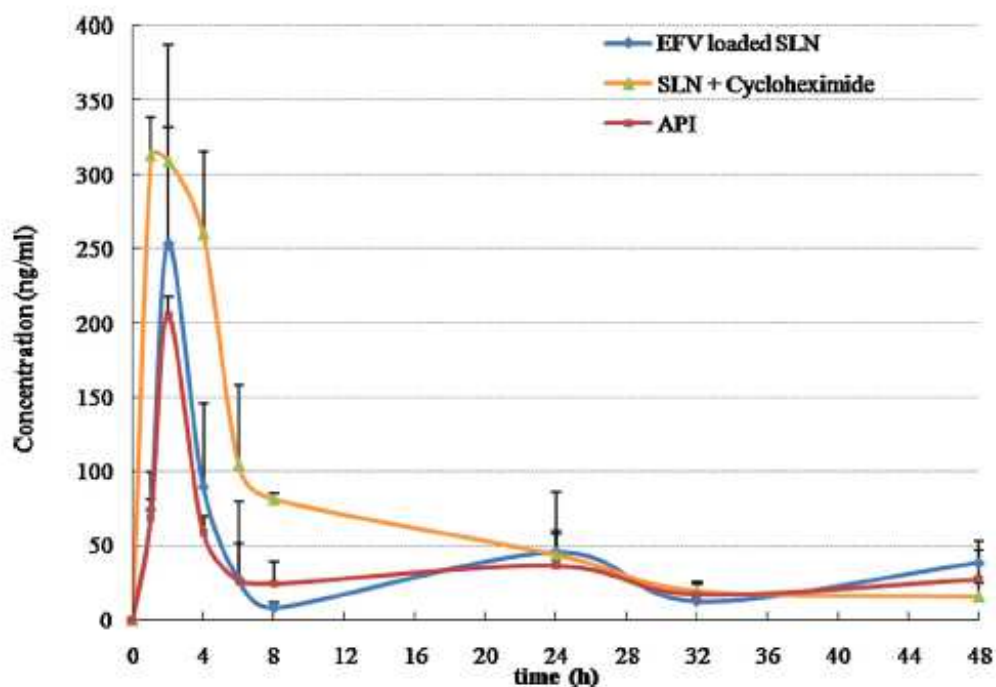
U nastavku rada prikazan je pregled primjene i prednosti SLN-a u formulacijama slabo topljivih i bioraspoloživih lijekova namijenjenih za oralnu primjenu.

#### **4.1.1 Primjena SLN čestica u antiviralnoj terapiji**

Virusne infekcije jedan su od vodećih zdravstvenih problema današnjice. Jedan od razloga je taj što se portfolio dostupnih terapija mora konstantno obnavljati zbog potencijalnog izlaganja novim sojevima virusa. Otprilike 78 milijuna ljudi zaraženo je virusom od početka epidemije dok je 39 milijuna izgubilo život (64). Prema podacima iz 2009. godine, globalno tržište antiretroviralnih lijekova iznosilo je 28 milijardi američkih dolara sa naznakama kontinuiranog rasta tržišta (47). Trenutno je na globalnom tržištu dostupno 40 odobrenih lijekova koji se koriste u liječenju virusa HIV-a, herpes virusa (HSV), humanog citomegalovirusa, hepatitisa B i C, te virusa gripe A i B. Većina terapija namijenjene su za oralnu primjenu. Problematika vezana uz antiviralne lijekove je ograničena topljivost, nisko vrijeme poluživota, niska bioraspoloživost te visoke individualne varijacije u koncentraciji lijeka u krvi što umanjuje efikasnost same terapije. Terapije koje i jesu efikasne u smanjenju razine virusa u krvnoj plazmi nisu efikasne kako bi dosegnule virusne čestice koje se akumuliraju u središnjem živčanom sustavu. Ako dođe do takve akumulacije, oboljele osobe razvijaju progresivne mentalne poremećaje koje mogu dovesti do smrti (64).

Lopinavir je antivirusni lijek iz skupine inhibitora proteaze čija je uloga spriječiti daljnje umnožavanje virusa HIV-a. Slabe je topljivosti i niske bioraspoloživosti. Intravenske formulacije zasad nisu dostupne te je povećanje bioraspoloživosti oralnih formulacija lopinavira dugo vremena tema brojnih istraživanja. Razlog tome su loša topljivost lijeka i njegova eliminacija metabolizmom prvog prolaska kroz jetru uz djelovanje citokrom P450 enzima i P-glikoproteina koji ograničava gastrointestinalnu apsorpciju lijeka. Zbog toga se lopinavir uzima zajedno s ritonavinom koji inhibira djelovanje citokrom P450 enzima te dijelom pospješuje njegovu apsorpciju. Ciljano mjesto djelovanja virusa je limfno tkivo pridruženo sluznici crijeva gdje je jako teško moguće nakupljanje molekula lijeka unatoč visokoj bioraspoloživosti lijeka u sistemskoj cirkulaciji. SLN čestice su se pokazali pogodnim terapijskim nanosustavima za dostavu lijeka u limfno tkivo (43, 48). Osim povećanja bioraspoloživosti povećava se i dostupnost lijeka u limfnom sustavu i njegovo zadržavanje u limfnom tkivu u koncentraciji koja može izazvati terapijski učinak u određenom vremenu. Reformulacijom oralnih pripravaka korištenjem SLN-a kao nosača lijeka moguće je poboljšati terapiju postojećim antiviralnim lijekovima. Efavirenz je lijek koji pripada BCS klasi II čije su karakteristike loša topljivost i visoka permeabilnost. Zbog loše topljivosti u vodi, efavirenz se eliminira iz sistemske cirkulacije metabolizmom prvog prolaska kroz jetru što rezultira niskom bioraspoloživosti (40-45%) (64). Formulacijom efavirenza u SLN koje su građene od triglicerida gliceril behenata (compritol 888 ATO) povećana je bioraspoloživost na mjestu djelovanja lijeka (49). Animalnim studijama na štakorima proučavan je mehanizam transporta efavirenza kroz limfno tkivo crijevnih sluznica. Napravljene su 4 grupe od kojih je jedna primala placebo (fiziološku otopinu), druga grupa je primala SLN-efavirenz, treća grupa koja je također primala SLN-efavirenz nakon primjene injekcija cikloheksimida koji blokira prolazak lijeka u limfno tkivo, te četvrta grupa koja je primala suspenziju efavirenza u vodi. Osim cikloheksimida put primjene u svim grupama je bio oralni. Pokazano je da je kod grupe životinja koja je primala efavirenz-SLN čestice u odnosu na grupu koja je primala vodenu suspenziju efavirenza, koncentracija efavirenza u jetri je bila 44.7% manja što je potvrda učinka smanjenog prvog prolaska kroz jetru. Usporedbom rezultata unutar grupa koje su primale SLN-efavirenz s i bez cikloheksimidom, količina efavirenza u jetri bila je veća kod grupe koja je primala cikloheksimid što ukazuje na izraženu bioraspoloživost u

sistemske cirkulaciji. Usporedbom profila koncentracije lijeka u plazmi u ovisnosti o vremenu (Slika 15), primijećene su niže vrijednosti AUC-a kod grupe koja nije primala cikloheksamid.



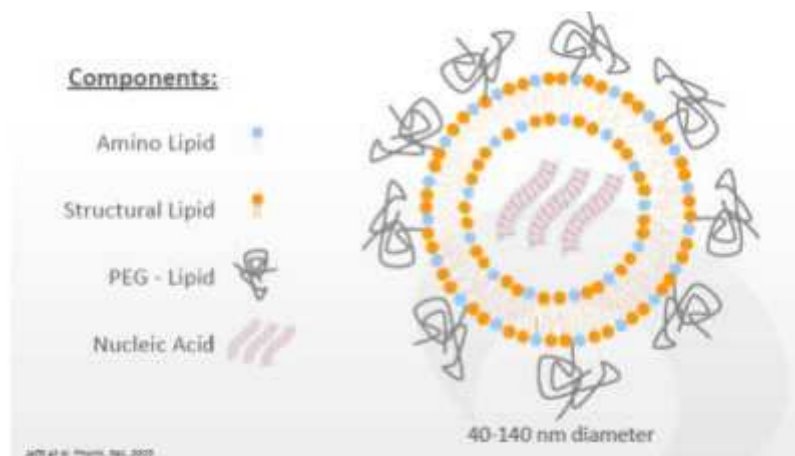
**Slika 15.** Profili koncentracije efavirenza u plazmi štakora nakon oralne primjene SLN- efavirenza (EFV) s i bez cikloheksimida i vodene suspenzije efavirenza (API) (49)

Daljnjom analizom koncentracije efavirenza u limfnom tkivu dobivene su koncentracijske vrijednosti od 98,73 ng/ml izmjerene u vremenu od 4 h nakon primjene i 147,11 ng/ml izmjerene u vremenu od 6 h nakon primjene. Rezultati provedenih ispitivanja su potvrdili da SLN čestice, osim što povećavaju biorasploživost efavirenza u usporedbi sa konvencionalnim terapijama, pospješuju prolazak lijeka kroz limfno tkivo. Većom dostupnosti efavirenza u limfnom tkivu izbjegnuta je njegova koncentracija u sistemske cirkulaciji i posljedično tome eliminacija lijeka metabolizmom prvog prolaska kroz jetru (49).

#### 4.1.2 Primjena SLN čestica u genskoj terapiji

Genski sustavi za dostavu lijeka mogu biti viralni i ne-viralni vektori. Viralni vektori pokazali su se kao najefikasniji, no ograničeni su u upotrebi zbog imunogenosti i male količine DNA koju mogu primiti (50). Kationski lipidi postali su od velikog interesa u razvoju nove generacije genskih terapija zbog mogućnosti *in vitro* transfekcije. Poznato je oko 30 komercijalno dostupnih proizvoda na bazi DNA-lipid kompleksa (Lipofectin<sup>®</sup>, Transfectam<sup>®</sup>, LipofectACE<sup>™</sup>). Problem ovih terapija je izražena toksičnost koja može dovesti do apoptoze stanica. SLN građene od kationskih lipida mogu stvoriti tzv. nanokomplekse koji zbog naboja mogu olakšati transfekciju stanica. Između ostalog SLN štite DNA od degradacije djelovanjem intracelularnih DNaza.

Svakako je važan podatak da je EMA u svom CHMP izvještaju (51) navela lijek TKM-Ebola (TKM-130803) kao jedan od potencijalnih kandidata u suzbijanju virusa ebole. TKM-Ebola je SLN terapijski nanosustav veličine 60-120 nm koja služi kao nosač interferirajuće RNA (Slika 16), a koja je dizajnirana kako bi reducirala ekspresiju EBOV L polimeraze i izazvala represiju EBOV replikacije. Prva formulacija TKM-100802 nije bila namijenjena borbi protiv samog uzročnika EBOV nego da reducira ekspresiju EBOV L polimeraze i suzbije replikaciju virusa. Mehanizam djelovanja sustava doima se jednostavno; SLN prolaze infektivne stanice endocitozom zbog čega se događa promjena pH koja izaziva otpuštanje dvaju siRNA komponenti (52). Iako su prekliničke studije na animalnim metodama rezultirale uspjehom, klinička studija TKM-130803 na pacijentima oboljelim od ebole nažalost nisu pokazale poboljšanje preživljenja (53). Neuspješnost kliničke studije pripisuje se činjenici da su pacijenti bili u već uznapredovanom stadiju bolesti te je primijenjena terapija bila nedovoljna u usporedbi sa stanjem pacijenata.



**Slika 16.** Lipidna nanočestica TKM-130803 (TKM-100802) (52)

#### 4.1.3 Primjena SLN čestica u imunosupresivnoj terapiji

Imunosupresivi su lijekovi uskog terapijskog područja i visoke intraindividualne varijabilnosti koncentracije lijeka u krvi zbog raznih fizioloških faktora i mogućih interakcija lijeka. U većini slučajeva, upotreba ovih lijekova zahtjeva individualiziranu terapiju i doziranje isključivo od strane liječnika budući da su razlike u kliničkom odgovoru i bioraspoloživosti lijekova kod pacijenata jako velike (54). Ciklosporin je imunosupresivni lijek koji se primjenjuje kao dio terapije poslije transplantacije organa ili koštane srži, te u liječenju autoimunih bolesti kao što su reumatoidni artritis, psorijaza i atopički dermatitis. Prema podacima iz PSUR-a (engl. *Periodic Safety Update Report*) koji pokriva period od 1. siječnja 2007. do 31. prosinca 2009., izloženost lijeku imalo je otprilike 4,9 mil. pacijenata (55). Problemi vezani uz sve komercijalno dostupne formulacije ciklosporina su izrazito niska i varijabilna apsorpcija lijeka (10-60%) zbog slabe topljivosti ciklosporina i izraženog učinka prvog prolaza lijeka kroz jetru, te visoka varijabilnost vremena ( $t_{max}$ ) i vršne koncentracije lijeka u krvi ili plazmi ( $C_{max}$ ) (56).

Komercijalno dostupni lijekovi Sandimmun Neoral/Optoral<sup>®</sup> (Novartis) u obliku kapsula ili oralne otopine su formulacije u obliku mikroemulzija koje omogućuje ravnomjerniju apsorpciju ciklosporina. Formulacija lijeka u obliku mikroemulzije naspram uljne otopine lijeka Sandimmun<sup>®</sup>, koja je prva dostupna komercijalna formulacija, smanjila je navedene varijacije.

No njihovom primjenom postiže se vršna koncentracija ciklosporina u plazmi preko 1000 ng/ml što uzrokuje nefrotoksičnost i hepatoksičnost. Uklapanjem ciklosporina u SLN čestice poboljšana je oralna apsorpcija lijeka i izbjegnuta nefrotoksičnost. Müller i suradnici (17, 56) su ispitivali dvije formulacije ciklosporina A uklopljene u SLN čestice i u obliku nanokristala. *In vivo* studija rađena je na tri mlade svinje primjenom spomenutih formulacija kao i lijeka Sandimmun Neoral®. Provedena su farmakokinetička ispitivanja tijekom 24 sata te određivana koncentracija lijeka u krvi u ovisnosti o vremenu. Studija je potvrdila već spomenute probleme formulacije Sandimmun Neoral/Optoral®; brza apsorpcija ciklosporina koja rezultira vršnom koncentracijom iznad 1400 ng/ml nakon 2 sata od primjene lijeka te polagano snižavanje koncentracije tokom vremena. Formulacija ciklosporina u obliku nanokristala nije postigla odgovarajuću bioraspoloživost, vrijednosti koncentracije lijeka u krvi bile su između 30 i 70 ng/ml kroz period od 14 sati te je formulacija ocijenjena kao neprikladna. Nakon primjene ciklosporina u obliku SLN čestica nije postignuta vršna koncentracija iznad 1000 ng/ml kao kod formulacije Sandimmun Neoral/Optoral®. Obje formulacije pokazale su svojstvo visoke intraindividualne varijabilnosti, a prema određivanim farmakokinetičkim parametarima potvrđeno je da nisu bioekvivalentne. Veća bioraspoloživost SLN-ciklosporina u odnosu na nanokristale može se objasniti i sljedećom pojavom, a to je efekt poboljšanja apsorpcije (engl. *mechanism of absorption promotion effect*). Lipidi se razlažu djelovanjem enzima lipaze na aktivne mono- i diacil- glicerole koji skupa sa žučnim solima formiraju micele koje zatim pospješuju apsorpciju lijeka u sistemsku cirkulaciju. Degradacija lipida ovisi o sastavu njegovog matriksa, kraći lanci masnih kiselina razlažu se brže u usporedbi sa dužim lancima. Oblik i građa molekula surfaktanta može utjecati na sporije ili brže vezanje lipaza na SLN sustav. Spomenuti efekt ukazuje na mogućnost daljnjih istraživanja prikladnih formulacija ciklosporina A korištenjem SLN-a kao terapijskog nanosustava. Ispitivanjem SLN formulacija različitog lipidnog sastava moguće je postići odgovarajući profil koncentracije lijeka u krvi (56).



## 4.2 Aspekti razvoja i karakterizacija SLN-a

Karakterizacija SLN-a izrazito je kompleksan proces. Topljivost lijeka u lipidnoj komponenti, polimorfizam i kristalne formacije lipida, stabilnost nastale koloidne disperzije, ključni su aspekti u razvoju formulacija temeljenih na SLN-u. Mogućnost formiranja raznih kristalnih oblika lipidnog matriksa omogućuje uklapanje lijeka u kristalne nesavršenosti do određenog kapaciteta. Upravo je kapacitet uklapanja lijeka (engl. *loading capacity*, skr. LC) ujedno i parametar koji ukazuje na stabilnost ovog oblika terapijskog nanosustava. Kristalna struktura i polimorfni oblik koji proizlazi iz kemijskog sastava i prirode lipida ključni faktor koji određuje da li će SLN zadržati molekule lijeka ili će doći do razgradnje sustava (17). Proces kristalizacije lipida neće se odvijati jednako u formiranim lipidnim nanočesticama kao na lipidnom materijalu u prirodnom obliku. Stoga je potrebno detaljno karakterizirati mehanizme i uvjete u kojima dolazi do destabilizacije sustava, posebice ako je riječ o formulaciji s kontroliranim oslobađanjem lijeka. Razvoj terapijskog nanosustava počinje od karakterizacije veličina čestica koja se kreće u rasponu veličina 1-100 nm. Na veličinu čestica mogu utjecati pomoćne tvari prisutne u formulaciji terapijskog nanosustava (lipidi, pomoćni i osnovni surfaktanti), odabrani proizvodni postupak i procesni parametri.

## 4.3 Fizikalno kemijska karakterizacija SLN-a

### 4.3.1 Veličina, morfologija i struktura SLN-a

SLN pripadaju koloidnim sustavima (veličina čestica  $<1000$  nm). Površinska svojstva takvih čestica određena su njihovim heterogenim sastavom i okruženjem u kojem se nalaze. Proces kristalizacije SLN-a ovisan je o uvjetima u kojima se događa (temperatura, koncentracija) i o prirodi materijala lipidne komponente i lijeka. Morfologija i unutarnja struktura čestica su direktno povezane s profilom oslobađanja lijeka te uspješnosti i kapacitetom uklapanja lijeka. Proučavanjem morfologije ili vanjskog oblika čestice proučava se struktura i karakteristike njezine površine. Čestice sferičnog oblika imaju najmanju moguću specifičnu površinu u usporedbi s drugim oblicima i time je potrebna jako mala koncentracija surfaktanta kako bi se

osigurala stabilnost koloidne disperzije SLN. Osim toga takvim oblikom ograničen je kontakt s okolnim medijem što također doprinosi stabilnosti cijelog sustava. Na oblik i veličinu čestica mogu utjecati formulacijski faktori: kemijski sastav i koncentracija osnovnog i/ili pomoćnog surfaktanta, kemijski sastav i omjer komponenti u smjesi lipida te procesni parametri ovisno o odabranoj metodi priprave, odnosno proizvodnom postupku. Utjecaj određenih faktora na željena svojstva SLN-a može se ispitati na dva načina; laboratorijskom pripremom određenog broja različitih pripravaka SLN-a i njihovom detaljnom fizikalno-kemijskom karakterizacijom ili primjenom odgovarajućih modela eksperimentalnog dizajna i matematičkih modela (57). Razumljivo je da oba načina ispitivanja utjecaja sastava formulacije na svojstva SLN-a imaju svoje prednosti i nedostatke. Detaljnom fizikalno-kemijskom karakterizacijom više potencijalnih pripravaka SLN-a moguće je uspostaviti korelaciju veličine čestica s nekim drugim svojstvom čestica, npr. sa zeta potencijalom ili s procesnim parametrima. To naravno može rezultirati dužim vremenskim trajanjem razvoja formulacije. S druge strane, primjenom matematičkih modela ispituje se korelacija točno određenih fizikalno-kemijskih svojstava, a vremenska ušteda tijekom faze razvoja je značajna. Osim omjera količina pojedinih komponenti SLN-a, na veličinu čestica utječe i HLB broj surfaktanta (58). Primjerice, korištenjem Pluronic F68 čiji je HLB broj veći od 24, dobivene su veće SLN čestice u odnosu na SLN proizvedene korištenjem Chromophore® EL (HLB  $\approx$  12-14), Tween®20 (HLB  $\approx$  16) i Tween®80 (HLB  $\approx$  15) surfaktanta.

Za mjerenje veličine čestica najčešće se koristi kombinacija tehnika fotonske korelacijske spektroskopije (engl. *photon correlation spectroscopy*, PCS) i laserske difrakcije (engl. *laser diffraction*, LD), koje djeluju na principu detekcije raspršene svjetlosti koja nastaje kretanjem čestica (58). Preduvjet je da čestice imaju pravilan oblik i određeni raspon veličine, od nekoliko nanometara do otprilike 3  $\mu$ m. S obzirom da tijekom kristalizacije lipidne komponente mogu nastati razne nepravilne strukture, potrebno je primijeniti komplementarne tehnike koje mogu detektirati veće čestice nepravilnog oblika. U literaturi se spominje kombinacija elektronske mikroskopske tehnike tzv. *cryo-field emission scanning electron microscopy* (cryo-FESEM) s IR i Raman spektroskopijom (59) koja može detektirati čestice nepravilnog oblika. Prednost elektronske mikroskopske tehnike cryo-FESEM je što se lipidne čestice ne moraju razdvajati od vodene faze te je umanjen utjecaj energije tokom mjerenja na sami uzorak (58). U istim uvjetima

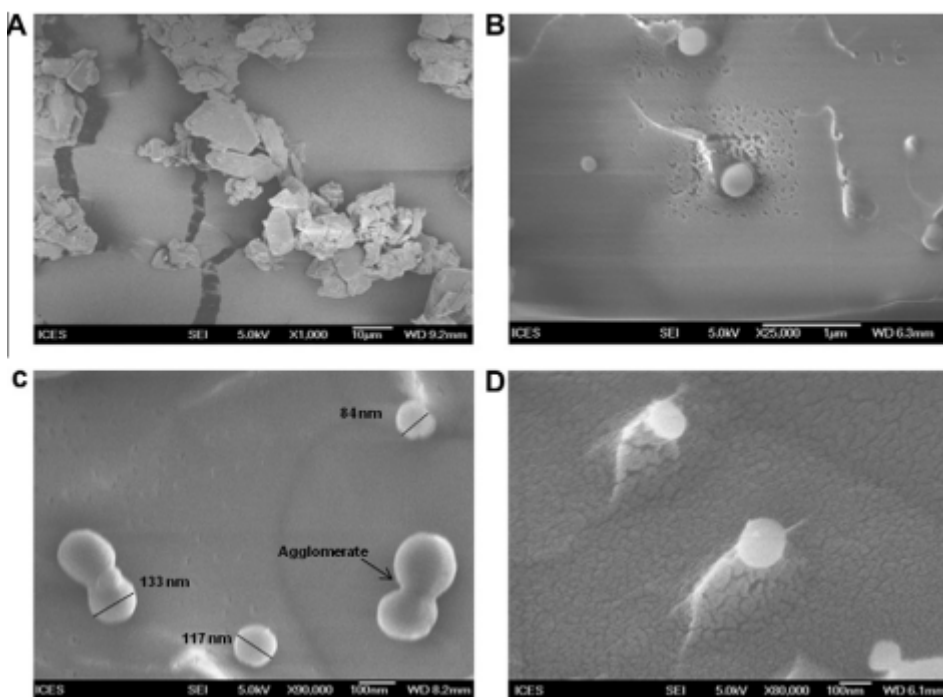
može se primijeniti i Raman spektroskopija, no primjenom te tehnike možemo dobiti samo podatke o strukturi i rasporedu površinskih molekula odnosno lanaca masnih kiselina (19). Tehnike elektronske mikroskopije pogodne su i za ispitivanje strukturnih promjena SLN čestica u kontaktu s različitim medijima. Glavni problem svih tehnika je moguća modifikacija sadržaja uzorka tokom njihove pripreme za analizu. SLN su osjetljive i na najmanje promjene tako da je izrazito važno pokazati podložnost metode na promjene uvjeta ispitivanja u odnosu na uvjete pohrane i pripreme uzoraka (17, 24, 31).

Ostale tehnike za karakterizaciju veličine i morfologije lipidnih nanočestica djeluju na principu raspršivanja svjetlosti i razdvajanja protočnim poljem (engl. *Field-flow Fractionation*, FFF ili FiFFF). Analitička tehnika razdvajanja protočnim poljem (FFF) djeluje na principu razdvajanja čestica prema njihovoj veličini, odnosno brzini kretanja opisanim Brownov-im gibanjem (60). Tehnika FFF ima jedinstvenu sposobnost separacije čestica preko cijelog raspona od 1 nm do 1000 nm, što je izrazito pogodno za koloidne sustave. Prednosti ove tehnike su velika selektivnost i moć razlučivanja čak i na nano- i submikro-metarskoj skali čime je primjenjiva i za razdvajanje bioloških makromolekula. No separacijske analitičke tehnike nisu dovoljne same po sebi jer nastali sadržaj treba detektirati te se sprežu s tehnikama kao što su identifikacija UV/VIS ili detekcijom svjetlosnim raspršenjem (engl. *Multi-angle Light Scattering*, MALS). Ovisno o svojstvu na temelju kojeg se razdvajaju čestice postoji niz izvedenih tehnika kao što je sedimentacijska (SdFFF), termička (ThFFF), protočna (FiFFF), električna (EiFFF) i magnetska (MgFFF).

Morfologija i unutarnja struktura SLN-a su važna fizikalno kemijska svojstva koja utječu na efikasnost uklapanja lijeka unutar čvrstih nanočestica. Unutarnja struktura SLN-a opisana je modelima spomenutim u poglavlju 1.2.2. i daje uvid u utjecaj pojedinih formulacijskih komponenti, lijeka i lipida. Oblik čestica govori o stabilnosti sustava predviđanjem interakcija s okolinom i kinetikom oslobađanja lijeka. Povećanje veličine čestica nakon određenog vremena skladištenja ukazuje na nestabilnost formulacije SLN-a jer dolazi do aglomeracije čestica u veće nakupine što je nepoželjan efekt. SLN sferičnog oblika imaju najmanju specifičnu površinu zbog čega se mogu stabilizirati s manjim količinama surfaktanta i imaju najduži put difuzije što uvjetuje produljeno oslobađanje lijeka iz SLN-a (24). Obrnuto, SLN veće specifične površine

rezultirati će bržim oslobađanjem lijeka iz sustava. Osim oblika, na brzinu oslobađanja lijeka utječe i veličina čestica (46). Produljeno oslobađanje tetrakaina u periodu od 6 h postignuto je kod SLN-a promjera većeg od 125  $\mu\text{m}$  dok je kod velikih SLN-a ( $<40\text{ }\mu\text{m}$ ) 100% lijeka oslobodeno već unutar prvog sata ispitivanja (46).

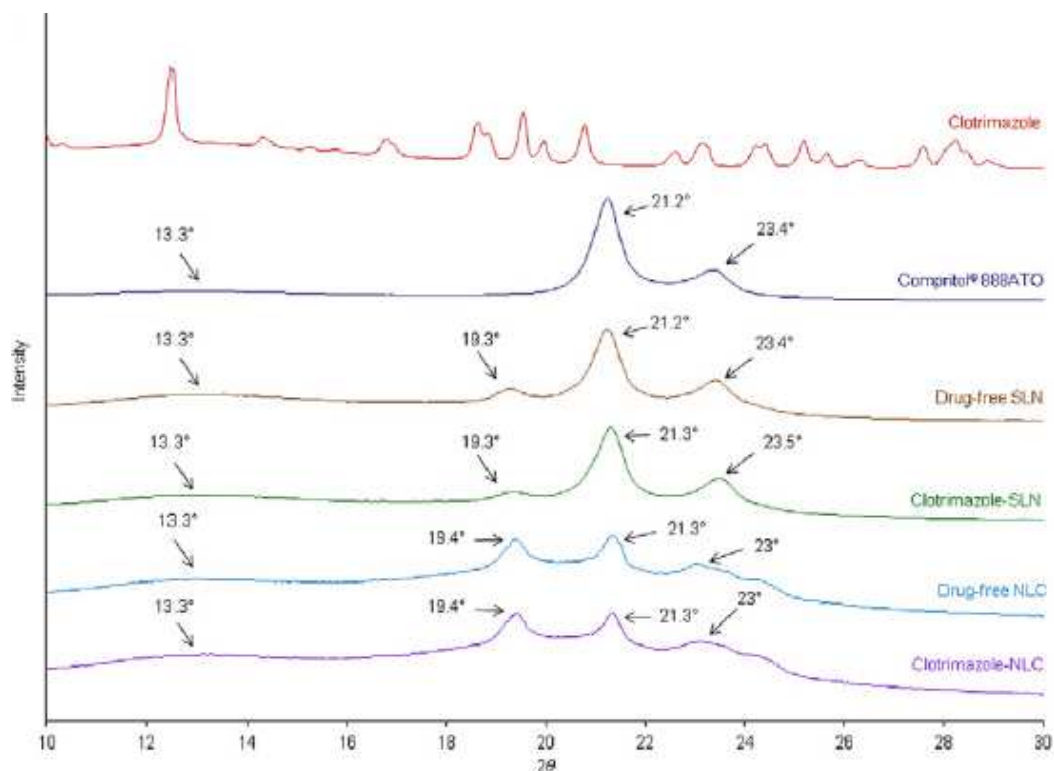
Na Slici 17 vidljiv je usporedni SEM (engl. *scanning electron microscopy*, SEM) prikaz klotrimazol čestica prirodnog materijala te lijeka uklopljenog u SLN i NLC. Slika pokazuje SLN i NLC čestice sferičnog oblika u veličinama raspona 50 do 150 nm te manje aglomerate koji se pripisuju ljepljivoj prirodi lipida (58). Primijećeno je da između SLN i NLC prikaza nema vidljive razlike.



**Slika 17.** Usporedni SEM prikaz A) materijala u prirodnom obliku (klotrimazol), B) i C) SLN čestica i D) NLC (58)

Usporedbom difraktograma (Slika 18) dobivenih metodom rendgenske difrakcije (engl. *x-ray diffraction*, XRD) na različitim uzorcima (klotrimazol, lipid, klotrimazol-SLN, klotrimazol-NLC, slobodnih NLC i SLN) mogu se razlučiti SLN i NLC formulacije. Iz prikaza (Slika 18) je također vidljivo da nema razlike između difraktograma slobodnih NLC/SLN i klotrimazol-

NLC/SLN što potvrđuje da je dodana količina lijeka uspješno uklopljena u lipidni matriks (58). S obzirom da se NLC razlikuju od SLN u vidu lipidne komponente (binarna smjesa čvrstog i tekućeg lipida), XRD metoda se čini kao prikladna komplementarna metoda za razlikovanje ova dva jako slična terapijska nanosustava.



**Slika 18.** Usporedni difraktogrami u redosljedju odozgo prema dolje: lijek (klotrimazol), lipid (Compritol® 888ATO), slobodne SLN, klotrimazol-SLN, slobodne NLC i klotrimazol-NLC na skali od  $10\text{-}30^\circ$  ( $2\theta$ ) (58)

#### 4.3.2 Polimorfizam i kristalizacija lipida

Polimorfizam i proces kristalizacije ključna su svojstva lipida kao glavne građevne komponente SLN-a (24). Većina proizvodnih postupaka podrazumijeva zagrijavanje lipida iznad točke tališta kako bi se formirala emulzija iz koje mogu nastati čestice u čvrstom obliku nakon dispergiranja u hladnoj vodenoj otopini. SLN će se formirati samo ako nastupi proces kristalizacije lipida. O brzini kristalizacije lipida ovisi i tip SLN-a. Ako kristalizacija lijeka nastupi prije kristalizacije

lipida, nastat će spremišni tip s lijekom uklopljenim u jezgri (17), obrnuto nastaje spremišni tip s lijekom uklopljenim u ovojnici (21, 46). Do kristalizacije lijeka prije kristalizacije lipida dolazi zbog prezasićenja taline lipida lijekom uslijed hlađenja. Kristalizacija lipida omogućuje uklapanje lijeka u nastale kristalne nesavršenosti nakon čega polimorfni prijelaz dodatno stabilizira SLN čestice. Uklapanje lijeka u amorfnim nakupinama u nastalim kristalnim nesavršenostima kristaliziranog lipida, predstavlja homogeni matriksni sustav (17, 24). Kritična temperatura kristalizacije je specifično svojstvo lipidnih materijala i njihov prirodni oblik je kristalni na sobnoj temperaturi. No nastankom koloidne disperzije hlađenjem u vodenoj otopini lipidi ne moraju nužno kristalizirati u čvrsti oblik što je preduvjet za nastanak SLN-a. Lipidni materijali koji kristaliziraju na temperaturama znatno nižim od temperature taljenja mogu dovesti do stvaranja emulzije pothlađene taline (engl. *emulsions of supercooled melts*) umjesto koloidne disperzije SLN-a koje su čvrstog oblika (61). Zato je potrebno ispitati sve uvjete i mehanizme nastanka emulzija pothlađenih taline kako bi prevenirali njihov nastanak. Trigliceride kratkih lanaca karakterizira usporeni proces kristalizacije čime je veća vjerojatnost nastanka emulzije pothlađene taline (28).

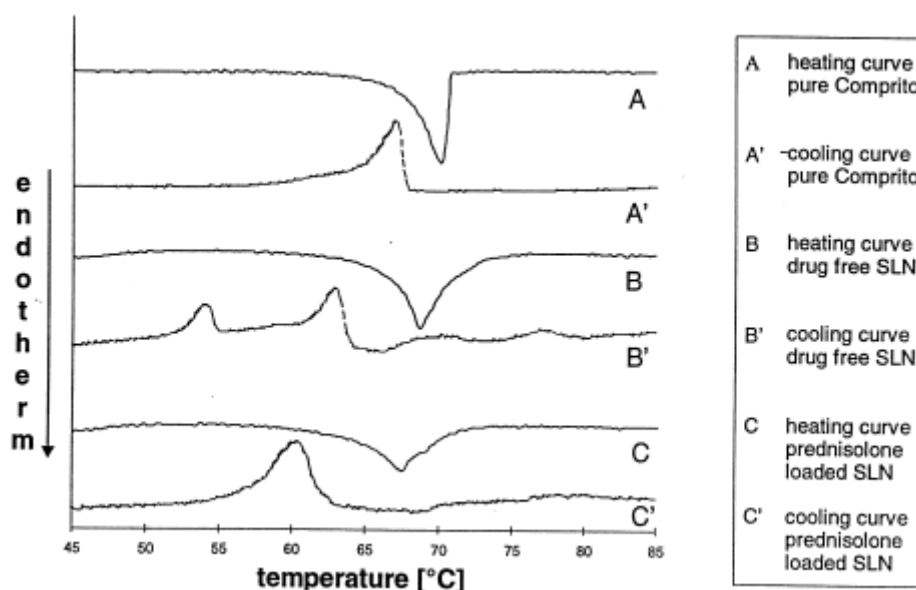
Svojstva polimorfizma i kristalizacije lipida prate se u dispergiranom stanju materijala kako bi se optimizirala temperatura proizvodnog postupka. Bunjes i sur. (61) su ispitivali utjecaj zasićenih mono- i tri-glicerida, dužine lanca od 12 do 18 ugljikovih atoma na proces kristalizacije i formiranje čvrstog lipidnog matriksa. Kao lipofilni modelni lijek koristili su menadion. Trigliceridi postoje u tri polimorfna oblika, najmanje stabilna forma  $\alpha$ , metastabilna forma  $\beta'$  i najstabilnija  $\beta$  forma. Prijelazi između formi se dešavaju brže ako se materijal nalazi u koloidalno dispergiranom obliku pa je potrebna i kontrola temperature u proizvodnoj fazi hlađenja koja vodi do formiranja čvrstog lipidnog matriksa. Polimorfni prijelazi nakon kristalizacije u lipidne nanočestice odvijaju se sporije kod triglicerida dužih lanaca. Ako se želi postići veći kapacitet uklapanja lijeka, potrebno je razviti SLN čestice s manje uređenom kristalnom rešetkom kako bi se formiralo više slobodnih mjesta za uklapanje lijeka, a za to su najbolji izbor kompleksne smjese triglicerida (62). Temperatura kristalizacije lipida kao materijala u prirodnom obliku nije jednaka ako je isti lipid u dispergiranom obliku (vrijednosti su obično dosta niže). Isto pravilo vrijedi i za brzine polimorfnih prijelaza iz  $\alpha$  i  $\beta'$  oblika u stabilnu  $\beta$  formu. Omjer komponenti u smjesi triglicerida ili čvrstih lipida uvelike utječe na brzinu

polimorfni prijelazi i kristalizacije tako da je potrebno ispitati više različitih omjera kako bi odredili najprikladniji. Veće količine surfaktanta u vodenoj otopini također mogu usporiti ili odgoditi kristalizaciju lipida (46).

Stabilnost disperzija SLN-a može se promijeniti i s vremenom skladištenja SLN-a u obliku koloidne disperzije. Zapaženo je da nakon nekog vremena određene formulacije formiraju strukturu gela pod utjecajem temperature, svjetlosti i vlage (63) što je nepovoljno stanje sustava jer čestice formiraju niz agregatnih nakupina i vodenih odjeljaka te mogu dovesti do ekspulzije lijeka. Izloženost bilo kojem vanjskom utjecaju gdje se kinetička energija čestica povećava, dovodi do učestalijih kolizija, oštećenja struktura SLN-a i poticanja procesa agregacije koje pogoduje nastanku gelova. Lipidi obično prvo kristaliziraju u nestabilne  $\alpha$  modifikacije zbog niže energije aktivacije, a zatim se dešava polagani polimorfni prijelaz iz  $\alpha$  u stabilnu  $\beta'$  formu koji se može inhibirati u prisustvu surfaktanta. Nastanak strukture gela upućuje na potpunu kristalizaciju lipida u stabilan  $\beta'$  oblik bez polimorfni prijelaza. Stabilni  $\beta'$  oblici nisu poželjni jer izazivaju promjene oblika nanočestica te uzrokuju ekspulziju lijeka iz sustava zbog tendencije prema kristalnoj „savršenosti“. Stoga je ispitivanje kristaliničnosti i polimorfizma lipidnog materijala u disperziranom obliku, ključan dio karakterizacije SLN-a (24, 62).

Postotak kristalizacije lipida može se odrediti diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (engl. *Differential Scanning Calorimetry*, DSC). Pomoću DSC krivulja je moguće detektirati temperaturne prijelaze uslijed zagrijavanja te na temelju entalpije taljenja izračunati postotak kristalizacije lipidnog materijala ugrađenog u SLN. Kao referentni materijal koristi se čisti lipid (100% entalpija), te se usporedbom DSC krivulja i entalpija taljenja (J/g materijala) može izračunati postotak kristalizacije SLN-a bez molekula lijeka (23, 24, 46). Mühlen i sur. (46) su DSC tehnikom karakterizirali SLN čestice pripravljene iz glicerol trilaurata kao lipidne komponente. DSC dijagrami su pokazali depresiju temperature taljenja (44,7 °C) u usporedbi s temperaturom taljenja čistog lipida (46,2 °C). Usporedbom entalpija taljenja dobivenih izračunom 170,3 na 116,5 J/g, dobiven je postotak kristalizacije lipida od 68,4% uz pretpostavku da je entalpija lipida 100%. Na postotak kristalizacije lipida utječe mala veličina čestica te prisutnost sojinog lecitina kao surfaktanta koji uzrokuje distorzije kristalne strukture lipidnog matriksa. Heterogena smjesa mono- i di-glicerida pokazala je manje izraženu depresiju točke

taljenja pa su time bili pogodniji za pripravu SLN-a. Uklapanje lijeka u lipidni matriks može ubrzati kristalizaciju lipida u stabilnije polimorfne oblike. Iz usporedbe DSC dijagrama SLN-a bez i s uklopljenim prednizolonom te čistog lipida komprimatola (Slika 19) vidljivo je da dijagram C koji predstavlja SLN s prednizolonom ima najmanji pik, odnosno najmanju entalpiju taljenja. Krivulja hlađenja SLN čestica bez molekula lijeka pokazuje 2 pika. Oni ukazuju na formiranje nestabilnog polimornog oblika koji se pak ne opaža na krivulji hlađenja SLN-a s prednizolonom (46). DSC tehnika nije uvijek prikladna i pouzdana kada se rade testiranja na koloidnim disperzijama. Zbog velikog udjela vode ograničava se temperaturni maksimum koji se može primijeniti te pojava širokih endotermnih pikova (62). U tom slučaju korištenje komplementarnih analitičkih tehnika kao što su protonska NMR spektroskopija visoke rezolucije ili rendgenska difrakcija je bolji izbor (58, 62).



**Slika 19.** DSC dijagrami zagrijavanja i hlađenja: A) nehomogeniziranog kompritol, B) SLN bez lijeka i C) SLN s uklopljenim lijekom prednizolon (46).

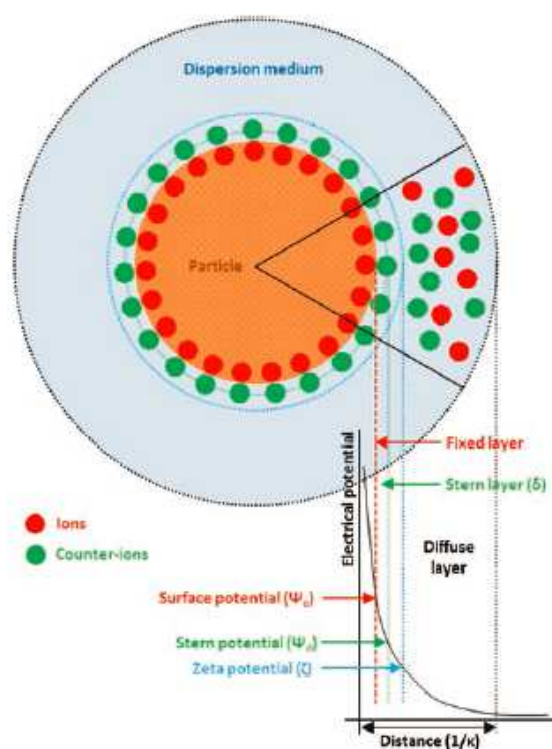
#### 4.3.3 Zeta potencijal i naboj na površini SLN-a

Površinske karakteristike SLN-a imaju značajan utjecaj na stabilnost cijelog sustava i dijelom na njihovo ponašanje u *in vivo* uvjetima. Naboj koji se generira na površini čestice proizlazi iz nekoliko izvora. Izvor može biti lipidna komponenta ako je po kemizmu kiselina (intrinzični



naboj) i surfaktant te njihove interakcije s vodenim medijem. SLN građene od kationskih lipida pokazali su se kao potencijalni terapijski sustavi za prijenos genetskog materijala zbog niza interakcija koje mogu ostvariti kako bi nastala *in vitro* transfekcija (45). Virusni vektori za koje se dosada smatralo efikasnim nosačima DNA, ograničeni su u upotrebi zbog imunogenosti i malih veličina DNA koje mogu nositi. U usporedbi s njima ne-virusni vektori, iako fiziološki prihvatljiviji nosači, imaju nisku efikasnost transfekcije (50). Naboj čestice u koloidnom sustavu se ne može direktno izmjeriti. Ono što se može detektirati je potencijal koji čestica može ostvariti tokom interakcije s okolnim medijem. Taj elektrostatski potencijal zovemo zeta potencijal ( $\zeta$ ) i važan je parametar koji nam daje sliku o stabilnosti sustava i mogućim interakcijama SLN-a. Zeta potencijal može se opisati fizikalnim modelom električnog dvosloja koji okružuje površinu čestice. Na Slici 20 je grafički prikaz električnog dvosloja koji se sastoji od vezanog ili fiksiranog sloja i slobodnog odnosno difuzijskog sloja („Gouy-Chapman“ sloj) koji se distribuira kroz medij i opisuje odnos čestice s okolnim ionima. Fiksirani ili vezani sloj opisan je s dvije površine, stvarna površina čestice i površina vezanih iona suprotnog naboja koji se još naziva i „Sternov sloj“. Vrijednost zeta potencijala dobivena mjerenjem prikladnim analitičkim tehnikama je razlika naboja odnosno razlika potencijala između difuznog i Sternovog sloja. Zeta potencijal najčešće se određuje se laserskom doppler anemometrijom koja se temelji na Dopplerovom pomaku. Mjerenje zeta potencijala predviđa stabilnost koloidne disperzije. Mogućnost agregacije čestica je umanjena ako čestice imaju visok zeta potencijal koji rezultira učestalim odbijanjima čestica (63). Zeta potencijal veći od  $|30|$  mV osigurava stabilnost sustava, odnosno disperzije SLN-a, dok potencijal veći od  $|60|$  mV predstavlja optimalnu vrijednost sustava koja će osigurati stabilnost kroz duži vremenski period. Potencijal ispod  $|5|$  mV vrlo često rezultira agregacijom SLN-a. Spomenute vrijednosti pokazane su na određenim modelima SLN-a tako da one mogu poslužiti samo kao informativne vrijednosti. Vrijednost zeta potencijala potrebna da stabilizira određeni sustav svakako će ovisiti o drugim parametrima kao što je stabilnost lipidne komponente, udio stabilizatora (surfaktant) u formulaciji i veličini čestica. Zeta potencijal je prema tome i stabilitetno-indikativni parametar. Velike promjene u vrijednosti zeta potencijala mogu ukazati na promjene kao što su formiranje gela ili rekristalizacija lipida (63). Raspon zeta potencijala od  $-30$  mV nije dovoljan za osiguranje stabilnosti kao što je pokazano sa SLN pripravljenim iz komprimitola (63). Zeta potencijal nanočestica izmjeren odmah nakon

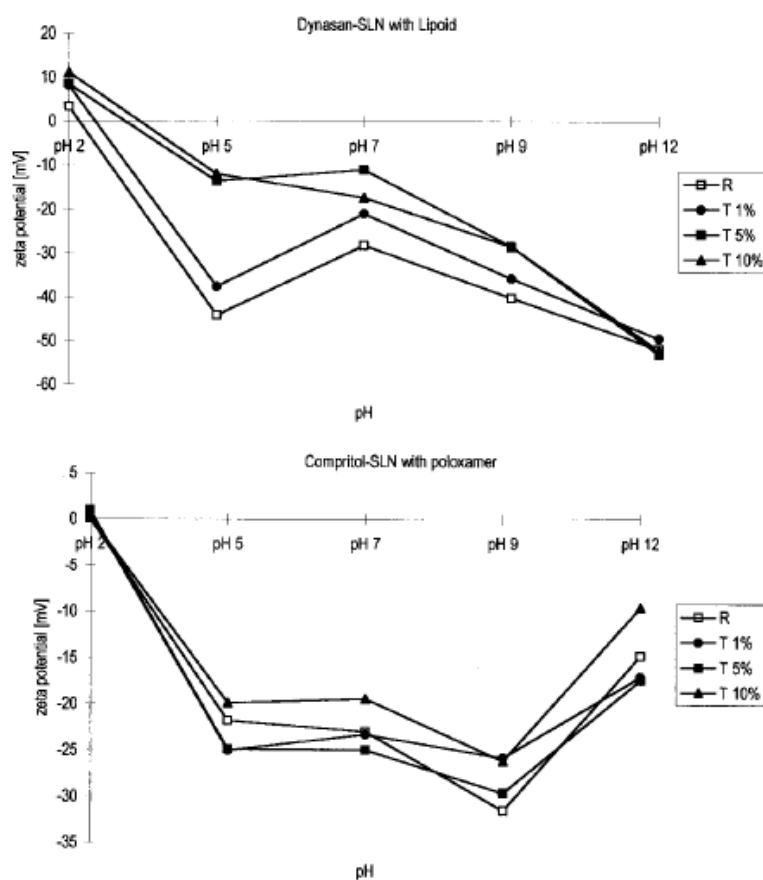
proizvodnje iznosio je -24,7 mV zatim je pao na -15,1 mV nakon jednog tjedna pohrane disperzije u staklene spremnike pod utjecajem umjetne svjetlosti. Zabilježeno je formiranje gela na temelju izmjerene vrijednosti promjera čestica (90% čestica bilo je veličine 52  $\mu\text{m}$ ). Mehanizam je nastupio nešto kasnije (nakon dva mjeseca) na uzorcima izloženim dnevnoj svjetlosti. Dobivene vrijednosti potvrdile su da je zeta potencijal u vrijednosti od  $|\geq 30|$  mV nužan za dobru stabilizaciju sustava uzimajući u obzir kontrolirane uvjete čuvanja. Također izloženost svjetlosti uzrokuje smanjenje vrijednosti zeta potencijala, što dovodi do mehanizma formiranja gela, odnosno destabilizacije disperzije SLN-a. Slični trendovi smanjenja vrijednosti zeta potencijala opažene su povećanjem temperature skladištenja otopine (63).



**Slika 20.** Shematski prikaz električnog dvosloja (24)

Osim svjetlosti i temperature, na vrijednost zeta potencijala mogu utjecati pH, ionska jakost i tip iona u SLN disperziji. Dodatkom elektrolita, promjenom pH vrijednosti medija, moguće je povećati elektrostatska odbijanja i time zadržati odgovarajuću vrijednost zeta potencijala. Utjecaj pH vrijednosti na vrijednost zeta potencijala ispitan na dva različita SLN modela vidljiv je na Slici 21. Na modelu sustava Dynasan-SLN je utjecaj pH vrijednosti manje izražen kod viših

koncentracija lijeka uklopljenih u same nanočestice, dok je prazna čestica kao referentni model pokazala najveće promjene u vrijednosti zeta potencijala. Kod oba modela, u području pH vrijednosti 5-7 promjene vrijednosti zeta potencijala su najmanje što ukazuje na stabilnost sustava i optimalnu pH vrijednost. Iako je kod sustava Dynasan-SLN povećan zeta potencijal u lužnatom dijelu pH vrijednosti, stabilnost sustava nije održiva na tako visokoj pH vrijednosti (65).



**Slika 21.** pH profili Dynasan-SLN i kompritrol-SLN u ovisnosti o zeta potencijalu uz upotrebu 5% stabilizatora (sojin lecitin i poloksamer). T = tetrakain u različitim koncentracijama, R = SLN čestica bez tetrakaina (65)

Ako se zeta potencijal određuje u destiliranoj vodi ili vodi niske konduktivnosti dobiva se informacija o naboju same površine čestice što znači bez razlike potencijala difuznog sloja i

Sternovog sloja. Zeta potencijal dodatno se povećava u prisustvu surfaktanta tako da je potrebno ispitati ovisnost vrijednosti zeta potencijala o određenoj koncentraciji surfaktanta (24).

#### **4.4 Fizikalna i kemijska stabilnost SLN-a**

Smanjenje veličine čestica na nanometarsku skalu dovodi do povećanja specifične površine materijala čime se naglašavaju njegova intrinzična svojstva. Održavanje stabilnosti SLN-a kao terapijskog nanosustava unatoč naglašenim intrinzičnim svojstvima lipidnih materijala je jedan od najvažnijih aspekata razvoja SLN-a s uklopljenim lijekom. Stabilnost SLN-a doprinosi sigurnosti i efikasnosti primjene formulacije lijeka. Problemi koji se mogu javiti tijekom uskladištenja su aglomeracija čestica, taloženje ili rast čestica formiranjem većih kristalnih nakupina, ovisno o uvjetima kojima su izloženi, bilo da je riječ o vodenoj disperziji SLN-a ili finalnom farmaceutskom obliku (tableta, kapsula, injekcije, itd.). Na stabilnost SLN-a mogu utjecati intrinzični (lipid, PAT, lijek, medij) i ekstrinzični parametri (temperatura, vlaga, uvjeti skladištenja, biološki medij) te je kontrola tih parametara ključna za održavanje stabilnosti.

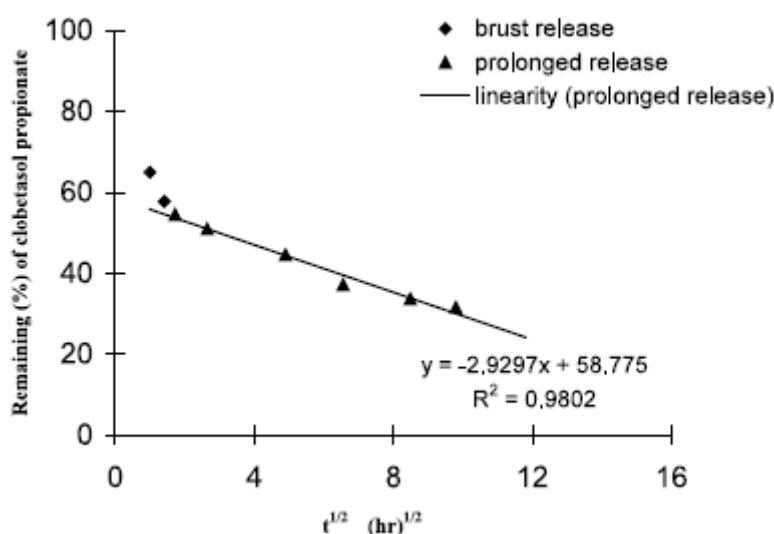
Najčešći mehanizmi koji dovode do nestabilnosti su stvaranje gela, agregacija čestica i nagla ekspulzija lijeka iz nanočestica (40). Najčešći stabilitetno-indikativni parametri kojim se prati stabilnost sustava su: veličina čestica (PCS i LD metode), zeta potencijal (PCS metoda) te stupanj ili postotak kristalizacije lipida (DSC metoda). Svjetlost i temperatura imaju utjecaj na rast čestica koji dovode do spomenutih mehanizama formiranja gela ili agregacije čestica (56). Formiranje gela u vodenoj disperziji komprimitol SLN-a stabiliziranih s poloksamerom 188 nastupilo je nakon 7 dana izloženosti umjetnom svjetlu i nakon 3 mjeseca izloženosti dnevnom svjetlu. Zeta potencijal kao stabilitetno-indikativni parametar se smanjio s -24,7 mV na -18 mV, što je ukazivalo na rast čestica. Sličan efekt zabilježen je tokom izloženosti disperzije povišenim temperaturama. Do rasta čestica nije došlo kod skladištenja disperzije u hladnjaku. Kao razlog koji potiče mehanizam formiranja gela navodi se oblik čestice i kemijski sastav surfaktanta. Iako su komprimitol SLN čestice sferičnog oblika što doprinosi stabilnosti sustava, slobodni dijelovi površine lipida koji nisu pokriveni surfaktanom ili mjesta gdje je film surfaktanta uništen, dolaze međusobno u kontakt i formiraju mrežu lipida. Taj mehanizam zasigurno potiču povišena temperatura i svjetlost. Važan intrinzični utjecaj na stabilnost sustava ima odabir lipidnog

materijala kojeg karakterizira određeni stupanj kristaliničnosti i brzina polimorfnih prijelaza. Sporiji proces kristalizacije i time polimorfni prijelazi lipida doprinose stabilnosti SLN-a. Ukoliko se polimorfni prijelazi odvijaju sporije potrebno je više vremena kako bi se postigao optimalni raspored lanaca različitih veličina (61, 62).

#### **4.5 Profili oslobađanja lijeka iz SLN-a i *in vitro-in vivo* korelacija**

Glavni nedostatak SLN-a kao terapijskih nanosustava je naglo oslobađanje lijeka uslijed razgradnje čestica. Razlog naglom oslobađanju lijeka su povišena temperatura i visoke koncentracije surfaktanta koje mogu destabilizirati sustav. Kako bi se postigao odgovarajući profil oslobađanja lijeka, potrebno je prije svega postići stabilan sustav. Prednizolon je prvi lijek uklopljen u SLN kojim je postignuto produljeno oslobađanje lijeka iz sustava (46). Prednizolon je kao izrazito lipofilni lijek inkorporiran u dva različita tipa SLN čestica građenih od monoglicerida (komprimitol 888 ATO) i triglicerida (Dynasan 112). Produljeno oslobađanje lijeka postignuto je u periodu od 5 tjedana pri čemu je 83,8% lijeka oslobođeno iz monogliceridnih i 37,1% iz trigliceridnih SLN-a. Razlika u količini oslobođenog prednizolona može se objasniti razlikom u temperaturama taljenja spomenutih vrsta lipida i topljivosti lijeka u lipidima. Tijekom proizvodnog postupka procesom kristalizacije formiraju se različiti tipovi SLN čija unutarnja građa odnosno raspored lipida i lijeka određuju kinetiku oslobađanja lijeka. Fizikalno kemijske karakteristike uklopljene djelatne tvari (lijeka) također utječu na profil oslobađanja. Manje lipofilni lijekovi kao što je primjerice tetrakain izdvajaju se brže iz lipidne u vodenu fazu tokom proizvodnje, čime kristalizacija lipida u lipidni matriks nastaje prije kristalizacije lijeka koji se kasnije formira kao ovojnica oko lipidnog matriksa, tj. nastaje spremišni tip s lijekom uklopljenim u ovojnici (46). Takav tip SLN-a uvijek rezultira profilom trenutnog oslobađanja lijeka za razliku od ostala dva modela. Prisutnost surfaktanta u formulaciji također može utjecati na oslobađanje lijeka. Kontrolirano i/ili produljeno oslobađanje lijeka može se postići tako da se formira homogeni matriksni sustav ili spremišni tip s lijekom uklopljenim u jezgri. Metodom difuzije otapala bez korištenja surfaktanta dobivaju su SLN s lipofilnim lijekom klobetazolom raspoređenim kroz cijeli lipidni matriks (37). Naglo oslobađanje lijeka ( $\approx 45\%$ ) primijećeno je u prva 3 sata, nakon čega se oslobađanje usporava. Faza

produljenog oslobađanja lijeka može se opisati Higuchi-jevim modelom (Slika 22). Bimodalni mehanizam oslobađanja klobetazola objašnjava se formiranjem kristalne rešetke lijeka unutar SLN-a. Unutarnja morfologija SLN-a karakterizirana je kao polimerni lipidni matriks u kojem je lijek u unutrašnjosti raspoređen u mikrokristaliničnom obliku dok je dio lijeka kristaliziran na samoj površini lipidnog matriksa koja je razlog prve faze naglog oslobađanja lijeka.



**Slika 22.** Profil oslobađanja klobetazola iz SLN čestica u vodenom mediju (40% PEG 400 i 0,5% Tween 80) (37)

Na primjeru fenofibrata, lijeka izrazito loše topljivosti i visoke permeabilnosti, veličina čestica je imala veliki utjecaj na oslobađanje lijeka iz SLN-a (39). Usporedbom tri oblika formulacija; u obliku SLN-a, mikronizirane fenofibrat formulacije i čistog lijeka, primijećene su velike razlike u koncentracijama oslobođenog lijeka. Određivanja profila oslobađanja lijeka iz SLN-a, provedeno je korištenjem je *in vitro* dijalizacijska metoda tehnika difuzijske vrećice kojom je zabilježeno da se nakon vremenskog perioda od 5h iz SLN-fenofibrat oslobodilo 94% lijeka, dok je iz formulacije mikroniziranog fenofibrata oslobođeno 62%, a iz formulacije čistog fenofibrata oslobodilo samo 41% lijeka. Usporedbom *in vitro* rezultata s rezultatima *in vivo* studija korištenjem animalnih modela (Tablica 5) na spomenute tri formulacije fenofibrata, moguće je uspostaviti odgovarajuću korelaciju. *In vivo* studija rađena je na animalnim modelima Wistar štakora kojima su formulacije primijenjene u stanju gladovanja. Mjerena je koncentracija metabolita lijeka fenofibratne kiseline. Iz dobivenih vrijednosti vidjelo se da je vrijeme

postizanja maksimalne koncentracije najkraće kod primjene formulacije SLN-fenofibrata te da je postignuta maksimalna koncentracija lijeka u plazmi skoro dvostruko veća od ostale dvije formulacije. Dobivene vrijednosti ukazuju da se apsorpcija fenofibrata povećava smanjenjem veličine čestica, kao i brzina otapanja lijeka u vodenom mediju. Najveća koncentracija lijeka u plazmi nakon 24 sata zabilježena je kod primjene formulacije SLN-fenofibrata (39).

**Tablica 5.** Farmakokinetički parametri fenofibrat formulacija (ispitivanja na štakorima) (39)

Parametar	SLN formulacija fenofibrata	Fenofibrat u čvrstom obliku	Mikronizirana formulacija fenofibrata
$T_{\max}$ (h)	4,42±0,40	6,9±0,5	6,5±0,4
$C_{\max}$ (µg/ml)	65,3±7,2	20,0±3,5	38,1±5,8
$AUC_{0-24}$ (h·µg/ml)	648±85	266±41	431±70
$AUMC_{0-24}$ (mg·h <sub>2</sub> /ml)	>5,34±0,53	2,31±0,22	3,51±0,32
$MRT_{0-24}$ (h)	8,24±0,50	8,66±1,40	8,14±0,70

$AUC$  je površina ispod krivulje,  $AUMC$  je površina ispod krivulje netom nakon primjene i  $MRT$  (engl. *mean residence time*) je prosječno vrijeme zadržavanja.

Iz dobivenih rezultata istraživanja očito je da su SLN izrazito pogodni za uklapanje slabo topljivih lijekova; pospješuju farmakokinetički profil povećanjem topljivosti lijeka zbog male veličine čestica.

#### 4.6 Primjena QbD koncepta tijekom razvoja i proizvodnje SLN-a

Koncept kvalitete utemeljene kroz eksperimentalni dizajn u upotrebi je u farmaceutskoj industriji već od ranih 1980-tih godina. Podrazumijeva sustavni pristup razvoju gotovih proizvoda kroz definiranje ciljanog profila kvalitete proizvoda (engl. *Critical Quality Attributes*, CQA), odabirom prikladnog proizvodnog postupka i definiranjem kritičnih procesnih parametara (engl. *Critical Process Parameters*, CPP) koji utječu na procjenu i upravljanje rizicima svojstava polaznih materijala i procesnih parametara na CQA (64). Upravo je procjena i upravljanje

rizicima najvažnija faza primjene QbD koncepta. Procjena utjecaja svojstava polaznih materijala i CPP-a radi se kroz metodu dizajn eksperimenta (engl. *Design of Experiments*, DoE) u definiranom prostoru dizajna.

Razvoj formulacije SLN-efavirenz u svrhu poboljšanja bioraspoloživosti efavirenza, primjer je primjene QbD koncepta u razvoju SLN kao terapijskih nanosustava (66). Zbog male veličine SLN-i su u mogućnosti proći određene fiziološke membrane te dopremiti lijek u izvornom obliku do mjesta djelovanja. Kako bi se zaobišao probavni sustav i izbjegnulo metabolizam lijeka u jetri, odabran je nazalni put primjene. Pretpostavljeno je da će apsorpcijom u stanicama sluznice nosa SLN čestice dospjeti preko cerebrospinalne tekućine do centralnog živčanog sustava gdje se virus vrlo često akumulira te uzrokuje razne neurološke poremećaje ili čak smrt pacijenata. Ciljani profil kvalitete SLN-a određen je parametrima veličine čestica i indeksa polidisperznosti te uspješnosti uklapanja lijeka u SLN (engl. *encapsulation efficiency*, EE). Kako bi se postigla povećana apsorpcija lijeka potrebno je postići najmanju moguću veličinu čestica, najmanji indeks polidisperznosti, visoku uspješnost uklapanja lijeka i zeta potencijal od najmanje  $\pm 20$  mV za postizanje stabilnosti sustava. Odabir prikladnog lipida određen je testiranjem topljivosti efavirenza u samom lipidu. Od šest potencijalnih lipida, odabran je gliceril tripalmitat u kojem je postignuta najveća topljivost ( $120 \pm 10$  mg lijeka na 1 g lipida). Odabir prikladnog surfaktanta određen je na temelju dobivenih izmjerenih vrijednosti CQA parametara pripravom SLN-a korištenjem gliceril tripalmitata kao lipida i šest različitih vrsta surfaktanta (Tablica 6).

**Tablica 6.** Eksperimentalne vrijednosti veličine čestica, indeksa polidisperznosti i uspješnosti uklapanja efavirenza kroz odabir različitih vrsta surfaktanta (statistički značajna razlika  $p < 0.05$ )

Lipid	Surfaktant	Veličina čestica (nm)	Indeks polidisperznosti	Uspješnost uklapanja EE (%)
Tripalmitin	Poloksamer 188	$566,4 \pm 7,4^{\#}$	$0,494 \pm 0,2$	$23,93 \pm 0,31$
Tripalmitin	Poloksamer 407	$891,1 \pm 8,1$	$0,363 \pm 0,3$	$16,50 \pm 0,51$
Tripalmitin	Poloksamer 245	$628,3 \pm 9,3$	$0,488 \pm 0,3$	$18,31 \pm 0,57$
Tripalmitin	Polisorbat 20	$697,4 \pm 9,7$	$0,511 \pm 0,4$	$17,33 \pm 0,49$
Tripalmitin	Polisorbat 60	$620,5 \pm 8,9$	$0,500 \pm 0,3$	$20,1 \pm 0,63$

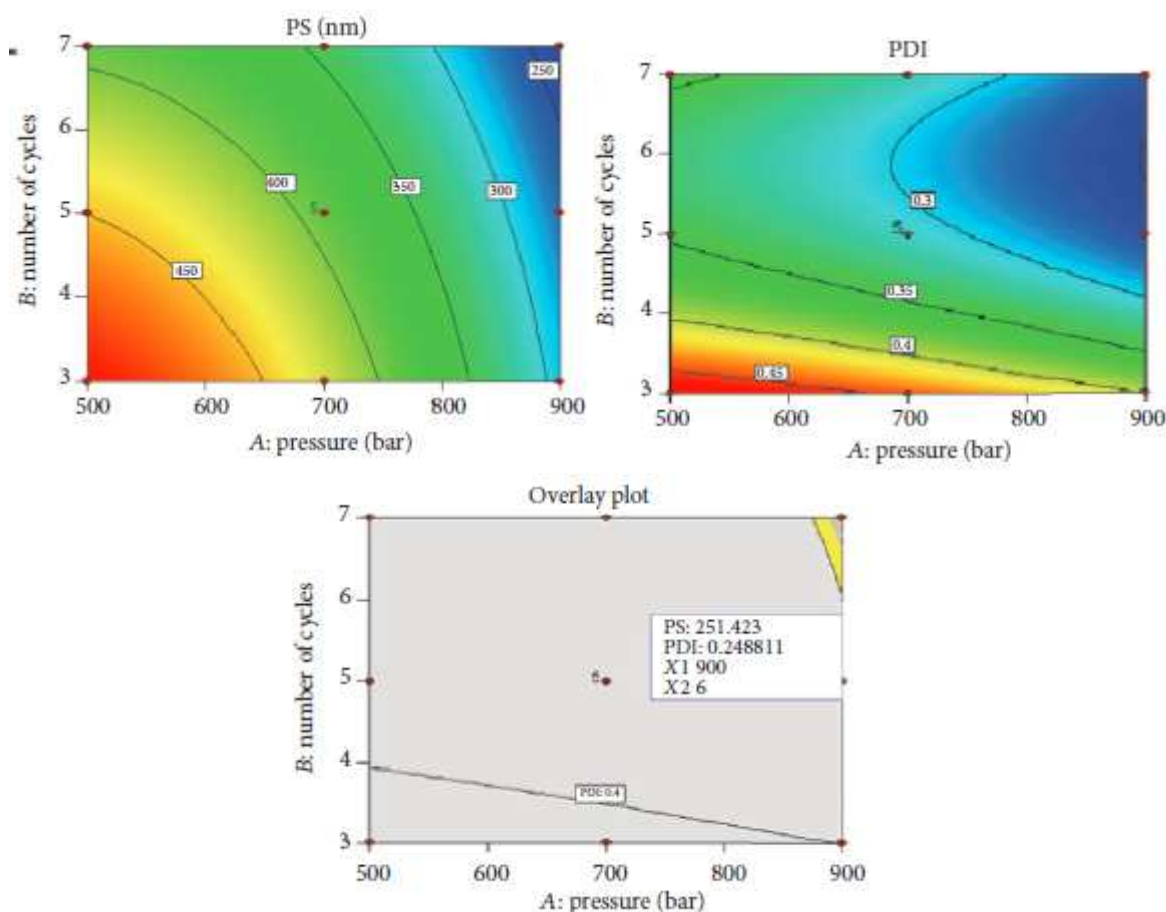


Tripalmitin	Polisorbat 80	601,3 ± 8,5	0,499 ± 0,3	21,23 ± 0,90
-------------	---------------	-------------	-------------	--------------

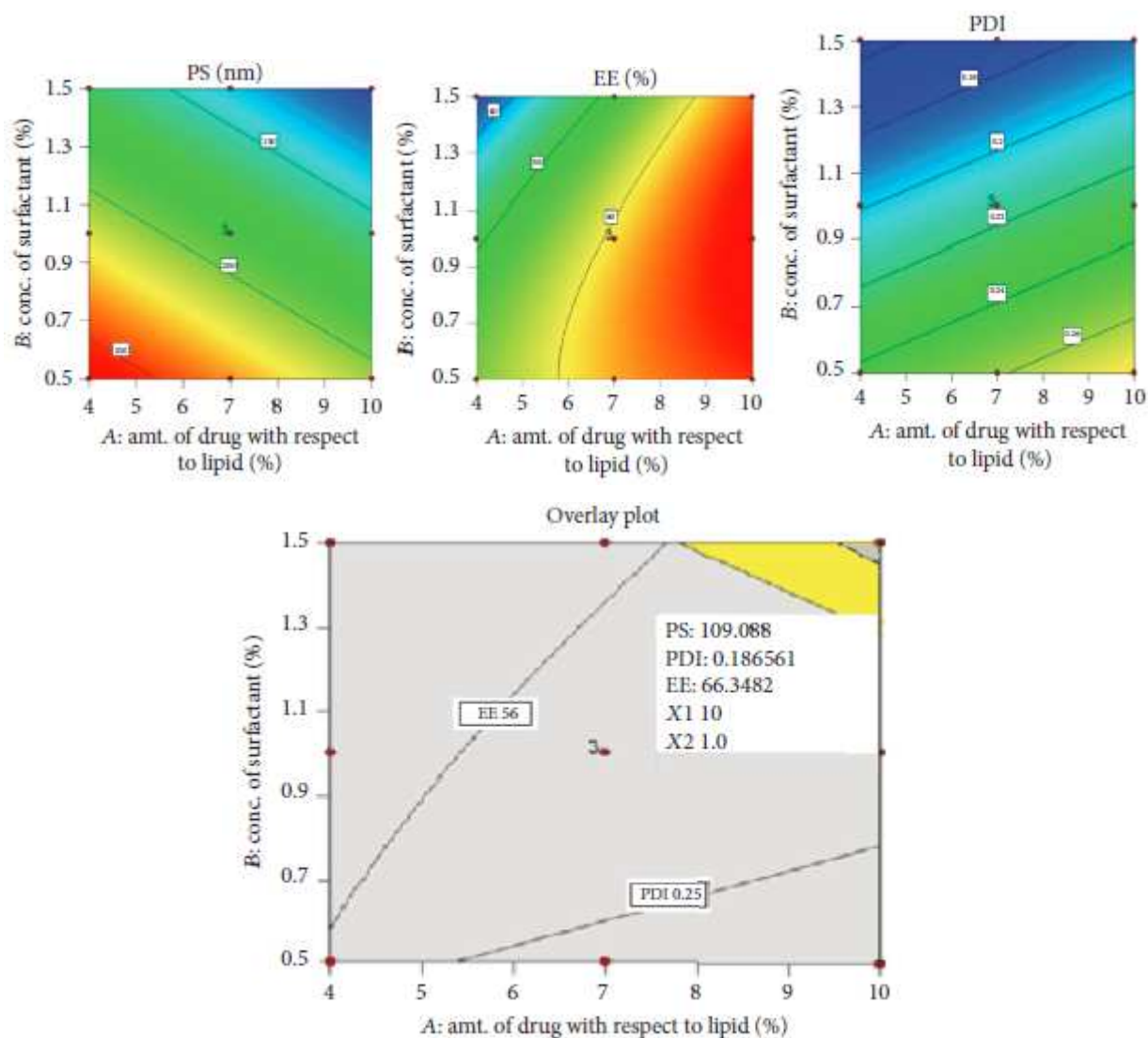
Iz dobivenih vrijednosti vidljivo je da je korištenjem Poloksamera 188 postignuta najmanja veličina SLN-a i najveća uspješnost uklapanja lijeka (EE). Poloksamer 188 kao pomoćna tvar posjeduje GRAS status koji potvrđuje sigurnost upotrebe u farmaceutskim pripravcima.

Za proizvodnju SLN-a s efavirenzom predložene su metoda isparavanja otapala i visokotlačne homogenizacije. Analiza CQA parametara nanočestica proizvedenih predloženim metodama pripreme, ukazala je na prikladnost postupka visokotlačne homogenizacije zbog postignute najmanje veličine čestica i najveće efikasnosti (uspješnosti) uklapanja lijeka. Produljenjem vremena trajanja postupka homogenizacije i povećanjem brzine tijekom postupka homogenizacije veličina čestica se smanjivala. Međutim, treba imati u vidu da takvi proizvodni uvjeti mogu potaknuti proces agregacije SLN-a koja se može pratiti povećanjem vrijednosti indeksa polidisperznosti. Za optimalne uvjete proizvodnog procesa odabrani su brzina miješanja od 10000 okretaja u minuti i vrijeme homogenizacije od 15 minuta. Određeni su kritični procesni parametri; tlak i broj ciklusa homogenizacije koji su optimizirani s obzirom na CQA korištenjem načela višefaktorijskog dizajna  $3^2$ . Dizajn eksperimenta uključivao je utjecaj procesnih varijabli kroz tri razine (tlak od 500, 700, 900 bara i broj ciklusa homogenizacije 3, 5, 7) na veličinu čestica i indeks polidisperznosti. U statističkoj obradi rezultata primijenjena je metode analize varijance (engl. *Analysis of Variance*, ANOVA) kako bi se odredio statistički značaj i veličina varijabilnosti zavisnih varijabli (veličina čestica i indeks polidisperznosti). Rezultati su pokazali da se povećanjem broja ciklusa i tlaka tokom homogenizacije smanjuje veličina čestica i indeks polidisperznosti. Grafičkim prikazom prostora dizajna (Slika 23) predviđene su vrijednosti veličine čestica 251,423 nm i indeksa polidisperznosti 0,248811. Karakterizacijom nanočestica na tzv. *check-point* seriji, dobivene su vrijednosti veličine čestica 259,7 nm i PDI 0,220 što je ujedno i eksperimentalna validacija prostora dizajna odnosno mjera pouzdanosti dobivenih podataka (66). Na isti način napravljena je i optimizacija formulacijskih faktora kao što je postotak udjela lijeka naspram lipida u finalnoj formulaciji SLN-a i koncentracija odabranog surfaktanta. Primjenom modela višefaktorijskog dizajna  $3^2$  formulacijski faktori kao nezavisne varijable promatrane su kroz tri različite razine naspram zavisnih varijabla veličine čestica,

indeksa polidisperznosti i uspješnosti uklapanja lijeka u sustav. U statističkoj obradi rezultata također je primijenjena metoda analize varijance ANOVA. Iz trodimenzionalnog grafičkog prikaza prostora dizajna (Slika 24) zapaženo je da se veličina čestica smanjuje povećanjem udjela lijeka u omjeru lijek:lipid i povećanjem koncentracije surfaktanta. Indeks polidisperznosti je također umanjen povećanjem koncentracije surfaktanta koji onemogućuje aglomeraciju nanočestica. Eksperimentalna potvrda prostora dizajna (Slika 24) napravljena je detaljnom karakterizacijom nanočestica iz tzv. *check-point* serije odabrane upotrebom odgovarajućeg programa. Dobivene su vrijednosti veličina čestica (109,088 nm), indeks polidisperznosti (0,186561) i efikasnost uklapanja lijeka (66,3482%). Postignuta veličina čestica od 110 nm pogodna je za nazalni put primjene dok izmjereni zeta potencijal od -21,2 mV ukazuje na stabilnost nanočestica unatoč visokom postotku uklopljenog lijeka (66).

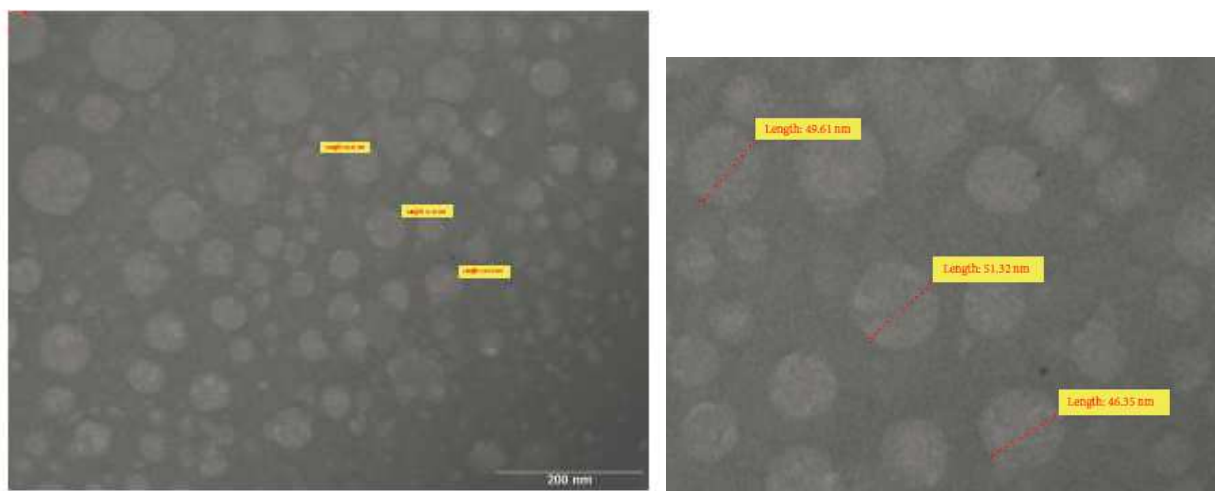


**Slika 23.** Grafički prikazi prostora dizajna procesnih parametara proizvodnog postupka (66)



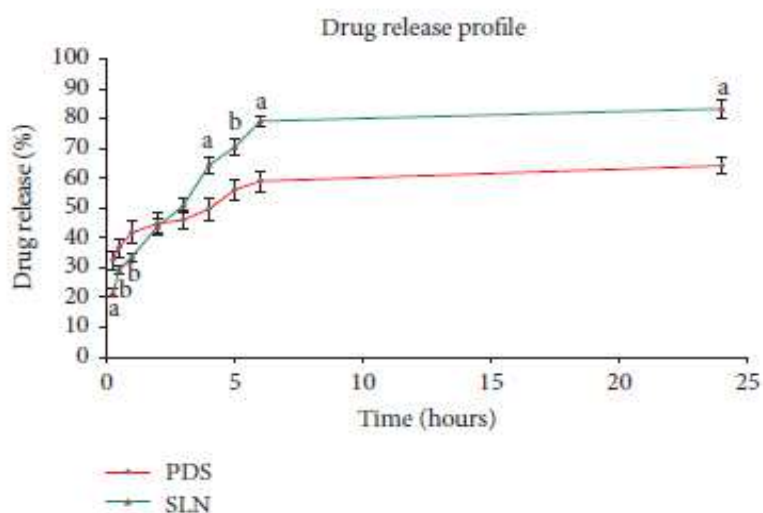
**Slika 24.** Grafički prikazi prostora dizajna formulacijskih parametara (66)

Tehnikom transmisivne elektronske mikroskopije određena je morfologija površine optimiziranih SLN-a. Slika 25 pokazuje sferični oblik nanočestica kojim se postiže najmanja specifična površina čestice zbog koje su kontakti sa okolnim medijem umanjeni te se mogu stabilizirati s manjim količinama surfaktanta.



**Slika 25.** Prikaz SLN čestica s uklopljenim efavirenzom dobiven transmissijskom elektronskom mikroskopijom (TEM) (66).

*In vitro* ispitivanje oslobađanja efavirenza iz SLN-a provedeno je metodom dijalize korištenjem dijalizacijskih vrećica. Usporedba profila oslobađanja lijeka iz dobivene SLN disperzije s klasičnom suspenzijom lijeka (Slika 26) ukazuje na produljeno oslobađanje lijeka u periodu do 6 sati i povećanje topljivosti efavirenza u vodenom mediju (nakon 24 sata oslobođeno je 83,4% efavirenza iz SLN-a u usporedbi sa 64,3% efavirenza iz standardnog oblika, suspenzije).



**Slika 26.** Profili oslobađanja efavirenza iz SLN čestica i standardne suspenzije lijeka (66).

*In vivo* animalne studije provedene su na odraslim Wistar albino štakorima podijeljenim u dvije skupine od po šest životinja. Prvoj ili testnoj skupini aplicirano je nazalnim putem 0,25 ml dobivene SLN suspenzije što odgovara dozi od 0,06 mg efavirena, dok je drugoj ili standardnoj skupini životinja oralno primijenjen komercijalno dostupni lijek Efavir® (sadržaj jedne kapsule 25 mg doze disperziran u 1 ml vode, dobivena suspenzija koncentracije 25 mg/ml). Određivana je koncentracija lijeka u uzorcima plazme životinja te koncentracija lijeka dospjela u mozak. Primjenom SLN suspenzije postignut je omjer koncentracije lijeka mozak:plazma od 15-61% u usporedbi sa omjerom od 0,104% za oralnu primjenu Efavir® pripravka što ukazuje na 150 puta veću bioraspoloživost lijeka na ciljanom mjestu djelovanja. Dobiveni rezultati mogu se objasniti zaobilaženjem prvog prolaska kroz jetru korištenjem nazalne SLN formulacije efavirena. Relativna bioraspoloživost SLN suspenzije iznosila je 70,11 što je 70 puta veća vrijednost od bioraspoloživosti komercijalno dostupne formulacije. Eksperimentalnim podacima pokazana je stabilnost SLN suspenzije u periodu od šest mjeseci na uvjetima čuvanja pripravka od  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  i  $25\pm 2^{\circ}\text{C}/60\pm 5\%\text{RH}$ . Pritom nisu zabilježene značajne promjene u vrijednostima dobivenih mjerenjem veličine čestica, indeksa polidisperznosti i zeta potencijala. Time je potvrđena uspješna primjena metode dizajna eksperimenta u razvoju SLN-efavirenz terapijskog nanosustava za nazalnu primjenu (66).

Primjena QbD principa i dizajna eksperimenta ujedno su i preduvjet za implementaciju koncepta kontinuirane proizvodnje što je pokazano u slučaju proizvodnje SLN-fenofibrat čestica kombinacijom metoda visoko tlačne homogenizacije i *hot-melt* ekstruzije (39). Primjena koncepta kontinuirane proizvodnje je poželjna ne samo s ekonomskog stajališta već i s aspekta kontrole utjecaja kritičnih procesnih parametara na CQA proizvoda od razvoja do izlaska na tržište. Poznavanje, predviđanje i upravljanje utjecajima na CQA proizvoda jedan je od načina osiguranja kontinuirane opskrbe lijekova na tržištu (9).

## 5. ZAKLJUČAK

- Terapijski nanosustavi temeljeni na lipidima siguran su i efikasan oblik nosača djelatne tvari zbog svoje biokompatibilnosti s fiziološkim sustavima, dok mala veličina nanočestica i lipidni sastav olakšava prolazak bioloških barijera te omogućuje dopremu lijeka u nepromijenjenom obliku do mjesta djelovanja.
- Čvrste lipidne nanočestice (SLN) su prva generacija lipidnih nanočestica. Mogu se proizvesti konvencionalnim proizvodnim postupcima i pokazuju širok raspon modifikacija u usporedbi s ostalim tipovima terapijskih nanosustava.
- Proizvodni postupci sastoje se od dvije važne faze: stvaranje emulzije nanočestica i disperzije u vodenoj sredini čime se omogućuje kristalizacija lipidne komponente. Nastala stabilna disperzija SLN čestica može se daljnjom obradom tehnikama sušenja prevesti u suhi oblik (prašak) koji se daljnjim proizvodnim postupcima može prevesti u finalni farmaceutski oblik za oralnu primjenu.
- Preduvjet nastanka SLN čestica u vodenoj disperziji je kristalizacija lipida i nastanak odgovarajućih metastabilnih polimorfnih oblika u čiju se nesavršenu strukturu ugrađuju molekule lijeka. Karakterizacija SLN čestica obuhvaća ispitivanja procesa kristalizacije i polimorfnih prijelaza lipida.
- Zbog izrazito kompleksnog razvoja i podložnosti najmanjim promjenama tijekom procesa, primjena QbD pristupa temeljenog na eksperimentalnom dizajnu nužni su za osiguravanje odgovarajuće kvalitete stabilne SLN disperzije kao i gotovog oblika lijeka.

## 6. LITERATURA

1. Feynman, R.P. (1959). *Plenty of Room at the Bottom*. American Physical Society.  
*Dostupno na:* [https://www.pa.msu.edu/~yang/RFeynman\\_plentySpace.pdf](https://www.pa.msu.edu/~yang/RFeynman_plentySpace.pdf). *Pristupljeno 22. studenog 2016.*
2. Vision Paper and Basis for a Strategic Research Agenda for Nanomedicine, Office for Official Publications of the European Communities, September 2009. *Available at:* <https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/60816548-e372-4216-a253-c4442b527a21/language-en>. *Pristupljeno 22. studenog 2016..*
3. European Commission Recommendation on the definition of nanomaterial, 2011/696/EU, 18 October 2011. *Dostupno na:* [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm). *Pristupljeno 22. studenog 2016.*
4. European Medicines Agency, Reflection paper on nanotechnology-based medicinal products for human use, June 2006. *Dostupno na:* [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Regulatory\\_and\\_procedural\\_guideline/2010/01/WC500069728.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Regulatory_and_procedural_guideline/2010/01/WC500069728.pdf). *Pristupljeno 22. studenog 2016.*
5. Doktorová, S., Kovačević, A.B., Garcia, L.M., Souto, E.B. (2016). Preclinical safety of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Current evidence from in vitro and in vivo evaluation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (108): 235 – 252.
6. Demetzos, C., Pippa, N. (2015). Fractal geometry as a new approach for proving nanosimilarity: A reflection note. *Int. J. Pharm.* (483): 1 – 5.
7. U.S. Food and Drug Administration, Nanotechnology Task Force Report 2007. *Dostupno na:* <https://www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/Nanotechnology/ucm2006659.htm>. *Pristupljeno 11. prosinca 2016.*
8. Hafner, A., Lovric, J., Perina Lakos, G., Pepic, I. (2013). Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions. 2014: 9(1). *Dostupno na:* <https://doi.org/10.2147/IJN.S55359>. *Pristupljeno 23. studenog 2016.*

9. Kumar, A., Mansour, H.M., Friedman, A., Blough, E.R. *Nanomedicine in drug delivery*. CRC Press, 2013.
10. Sainz, V., Conniot, J., Matos, A.I., Peres, C., Zupančič, E., Moura, L., Silva, L.C., Florindo, H.F., Gaspar, R.S. (2015). Regulatory aspects on nanomedicines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (468): 504 – 510.
11. Shrestha, H., Bala, R., Arora, S.(2014). Lipid-Based Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutics*. (2014). Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/801820>. Pristupljeno 8. rujna 2017.
12. Rawat, M., Deependra, S., Saraf, S., Saraf, S. (2007). Lipid carriers: A Versatile Delivery Vehicle for Proteins and Peptides. *The Pharmaceutical Society of Japan*. (128): 269 – 280.
13. Tinkle, S., McNeil, S.E., Mühlebach, S., Bawa, R., Borchard, G., Barenholz, Y., Tamarkin, L., Desai, N. (2014). Nanomedicines: addressing the scientific and regulatory gap. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* (1313): 35 – 36.
14. Chustecka, Z. (2013). Generic Version of Liposomal Doxorubicin Approved in US. Dostupno na: <https://www.medscape.com/viewarticle/778716>. Pristupljeno 23. studenog 2016.
15. Mukherjee, S., Ray, S., Thaur, R.S. (2009). Solid Lipid Nanoparticles: A modern formulation approach in Drug Delivery System. *Indian J. Pharm. Sci.* (71(4)): 349 – 358.
16. Svilenov, H., Tzachev, C. Solid lipid nanoparticles – A promising drug delivery system. Seifalian, A., del Mel, A., Kalaskar, D.M. (2014). *Nanomedicine*. Manchester: One Central Press (OCP). Dostupno na: <http://www.onecentralpress.com/solid-lipid-nanoparticles-a-promising-drug-delivery-system/>. Pristupljeno 30. ožujka 2017.
17. Müller, R.H., Mäder, K., Gohla, S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (50). 161 – 177.
18. Lucks, S., Müller, R. WIPO Patent No. 1993005768. Geneva, Switzerland: World Intellectual Property Organization, 1993. Dostupno na: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO1993005768>. Pristupljeno 30. ožujka 2017.



19. Joshi, M.D., Müller, R.H. (2009). Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (71): 161 – 172.
20. Soni, K., Kukereja, K.B., Kapur, M., Kohli, K. (2015). Lipid nanoparticles: Future of Oral Drug Delivery and their Current Trends and Regulatory Issues. *Int J Curr Pharm Res.* (7): 1 – 18.
21. Müller, R.H., Kayser, O., Wissing, S.A. (2004). Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (56): 1257 – 1272.
22. Wong, H.L., Bendayan, R., Rauth, A.M., Xue, H.Y., Babakhanian, K., Wu, X.Y. (2006). A mechanistic study of enhanced doxorubicin uptake and retention in multidrug resistant breast cancer cells using a polymer-lipid hybrid nanoparticle (PLN) system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (317): 1372 – 1381.
23. Freitas, C., Muller, R.H. (1999). Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles and crystallinity of the lipid phase. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (47): 125 – 132.
24. Shah, R., Eldrige, D., Palombo, E., Harding, I. (2015). Lipid Nanoparticles: Production, Characterization and Stability. Springer. ISSN 1864-8126.
25. Silva, A.C., Kumar, A., Wild, W., Ferreira, D., Santos, D., Forbes, B. (2012). Long-term stability, biocompatibility and oral delivery potential of risperidone-loaded solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* (436): 798 – 805.
26. Wang, T., Xue, J., Hu, Q., Zhou, M., Luo, Y. (2017). Preparation of lipid nanoparticles with high loading capacity and exceptional gastrointestinal stability for potential oral delivery applications. *J. Colloid Interface Sci.* (507): 119 – 130.
27. Lucks, S., Muller, R.H. (1994). Medication vehicles made of solid lipid particles (solid lipid nanospheres – sln). EP 0605497 A1. *Dostupno na:*  
<http://www.google.tl/patents/EP0605497A1?cl=en>. *Pristupljeno 22. studenog 2016.*
28. Jennings, V., Lippacher, A., Gohla, S.H. (2002). Medium scale production of solid lipid nanoparticles (SLN) by high pressure homogenization. *J. Microencapsulation.* (19): 1 – 10.
29. Gasco, M.R. (1993). Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution, US Patent 5 250 236.

30. Gasco, M.R. (1997). Solid lipid nanospheres from warm micro-emulsions. *Pharm. Technol. Eur.* (9): 52 – 58.
31. Shah, R.M., Malherbe, F., Eldrige, D., Palombo, E.A., Harding, I.H. (2014). Physicochemical characterization of solid lipid nanoparticles (SLNs) prepared by a novel microemulsion technique. *J. Colloid Interface Sci.* (428): 286 – 294.
32. Shah, R.M., Eldridge, D.S., Palombo E.A., Harding, I.H. (2017). Microwave-assisted microemulsion technique for production of miconazole nitrate- and econazole nitrate-loaded solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* (117): 141 – 150.
33. Hecq, J., Amighi, K., Goole, J. (2016). Development and evaluation of insulin-loaded cationic solid lipid nanoparticles for oral delivery. *J Drug Deliv Sci Technol.* (36): 192 – 200.
34. Liu, J., Gong, T., Wang, C., Zhong, Z., Zhang, Z. (2006). Solid lipid nanoparticles loaded with insulin by sodium cholate-phosphatidylcholine-based mixed micelles: Preparation and characterization. *Int. J.Pharm.* (340): 153 – 162.
35. Leroux, J., Allemann, E., Doelker, E., Gurny, R. (1995). New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method. *Eur J Pharm Biopharm.* (41): 14 – 18.
36. Quintanar-Guerrero, D., Fessi, H., Allemann, E., Doelker, E. (1996). Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D, L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification- diffusion technique. *Int J Pharm* 143(2): 133 – 141.
37. Hu, F.Q., Yuan, H., Zhang, H.H., Fang, M. (2002). Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. *Int. J.Pharm.* (239): 121 – 128.
38. Trotta, M., Debernardi, F., Caputo, O. (2003). Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent diffusion technique. *Int. J.Pharm.* (257): 153 – 160.
39. Patil, H., Feng, X., Ye, X., Majumdar, S., Repka, M.A. (2014). Continuous Production of Fenofibrate Solid Lipid Nanoparticles by Hot-Melt Extrusion Technology: a Systematic Study Based on a Quality by Design Approach. *AAPS J.* (17): 194 – 205.
40. Maniruzzaman, M., Nokhodchi, A. (2017). Continuous manufacturing via hot-melt extrusion and scale up: regulatory matters. *Drug Discov. Today.* (22): 340 – 351.

41. Benita, S. (2006). Microencapsulation – Methods and Industrial Applications, Chapter 4. Taylor & Francis Group. New York. *Dostupno na:*  
<http://www.crcnetbase.com/isbn/9780824723170>. *Pristupljeno 22. studenog 2016.*
42. Das, S., Chaundhury, A. (2011). Recent Advances in Lipid Nanoparticle Formulations with Solid Matrix for Oral Drug Delivery. *AAPS PharmSciTech.* (12): 62 – 74.
43. Martins, S., Costa-Lima, S., Carneiro, T., Cordeiro-da-Silva, A., Souto, E.B., Ferreira, D.C. (2012). Solid lipid nanoparticles as intracellular drug transporters: An investigation of the uptake mechanism and pathway. *Int. J. Pharm.* (430): 216 – 227.
44. Uner, M., Yener, G. (2007). Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives. *Int. J. Nanomedicine.* 2(3): 289 – 300.
45. Muller, R.H., Maassen, S., Schwarz, Mehnert, W. (1997). Solid lipid nanoparticles (SLN) as potential carrier for human use: interaction with human granulocytes. *J. Control. Release.* (47): 261 – 269.
46. zur Mühlen, A., Schwarz, C., Menhert W. (1997). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - drug release and release mechanism. *Eur J Pharm Biopharm.* (45): 149 – 155.
47. Lembo, D., Cavalli, R. (2010). Nanoparticulate delivery systems for antiviral drugs. *Antivir. Chem. Chemother.* (21): 53 – 70.
48. Aji Alex, M.R., Chacko, A.J., Jose, S., Souto, E.B. (2010). Lopinavir loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for intestinal lymphatic targeting. *Eur. J. Pharm. Sci.* (42): 11 – 18.
49. Makwana, V., Jain, R., Patel, K., Nivsarkar, M., Joshi, A. (2015). Solid lipid nanoparticles (SLN) of Efavirenz as lymph targeting drug delivery system: Elucidation of mechanism of uptake using chylomicron flow blocking approach. *Int. J. Pharm.* (495): 439 – 446.
50. Del Pozo-Rodriguez, A., Delgado, D., Angeles Solinis, M., Pedraz, J.L., Echevarria, E., Rodriguez, J.M., Gascon, A.R. (2009). Solid lipid nanoparticles as potential tools for gene therapy: In vivo protein expression after intravenous administration. *Int. J. Pharm.* (385): 157 – 162.
51. EMA/204393/2016, CHMP assessment report. February 2016. Review under Article 5(3) of Regulation (EC) No 726/2004; Medicinal products under development for the

- treatment of Ebola. *Dostupno na:*  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Report/2016/03/WC500203202.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2016/03/WC500203202.pdf). *Pristupljeno 8. siječnja 2017.*
52. EMA/756544/2014 Rev.1, CHMP Interim assessment report. Review under Article 5(3) of Regulation (EC) No 726/2004; Medicinal products under development for the treatment of Ebola. *Dostupno na:*  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Report/2014/12/WC500179062.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2014/12/WC500179062.pdf). *Pristupljeno 8. siječnja 2017.*
53. Dunning, J., et al. (2016). Experimental Treatment of Ebola Virus Disease with TKM-130803: A Single-Arm Phase 2 Clinical Trial. *Dostupno na:*  
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001997>. *Pristupljeno 8. siječnja 2017.*
54. Ciklosporin Alkaloid® 25 mg, 50 mg, 100 mg meke kapsule. Sažetak opisa svojstava lijeka. *Dostupno na:* <http://www.almp.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-08-01-351>. *Pristupljeno 8. siječnja 2017.*
55. EMA. 25 September 2013. Assessment report for Sandimmun and associated names. *Dostupno na:*  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Referrals\\_document/Sandimmun\\_30/WC500160218.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/Sandimmun_30/WC500160218.pdf). *Pristupljeno 8. siječnja 2017.*
56. Müller, R.H., Runge, S., Ravelli, V., Mehnert, W., Thünemann, A.F., Souto, E.B. (2006). Oral bioavailability of cyclosporine: Solid lipid nanoparticles (SLN®) versus drug nanocrystals. *Int. J. Pharm.* (317): 82 – 89.
57. Asasutjarit, R., Lorenzen, S.I., Sirivichayakul, S., Ruxrungtham, K., Ruktanonchai, U., Ritthidej, G.C. (2007). Effect of Solid Lipid Nanoparticles Formulation Compositions on Their Size, Zeta Potential and Potential for *In Vitro* pHIS-HIV-Hugag Transfection. *Pharm. Res.* (24): 1098 – 1107.
58. Das, S., Kiong Ng, W., Tan, R.B.H. (2012). Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? *Eur. J. Pharm. Sci.* (47): 139 – 151.

59. Saupe, A., Gordon, C.K., Rades T. (2006). Structural investigations on nanoemulsions, solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers by cryo-field emission scanning electron microscopy and Raman spectroscopy. *Int. J. Pharm.* (314): 56 – 62.
60. Mijić, I., Madunić, J., Marinc, S., Cindrić, M. (2013). Razdvajanje protočnim poljem u analizi kompleksnih bioloških uzoraka. *Kem. Ind.* (63): 99 – 106.
61. Bunjes, H., Westesen, K., M.J. Koch, M. (1996). Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. *Int. J. Pharm.* (129): 159 – 173.
62. Westesen, K., Bunjes, H., Koch, M.H.J. (1997). Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. *J. Control. Release.* (48): 223 – 236.
63. Freitas, C., Muller, R.H. (1998). Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN<sup>TM</sup>) dispersions. *Int. J. Pharm.* (168): 221 - 229.
64. Beti Blašković, N. (2016). Primjena koncepta kakvoće utemeljene kroz dizajn u životnome ciklusu metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. *Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:300450>. Pristupljeno 24. lipnja 2017.*
65. Schwarz, C. Mehnert, W. (1999). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery II. Drug incorporation and physicochemical characterization. *J. Microencapsulation.* (16): 205 – 213.
66. Gupta, S., Kesarla, R., Chotai, N., Misra, A., Omri, A. (2017). Systematic Approach for the Formulation and Optimization of Solid Lipid Nanoparticles of Efavirenz by High Pressure Homogenization Using Design of Experiments for Brain Targeting and Enhanced Bioavailability. *BioMed Research International.* (2017). Article ID 5984014: 1 – 18.

## KRATICE

<b>API</b>	engl. <i>Active Pharmaceutical Ingredient</i>	Djelatna tvar
<b>AUC</b>	engl. <i>Area Under the Curve</i>	Područje ispod krivulje
<b>AUCM</b>	engl. <i>Area Under the first Moment Curve</i>	Područje ispod krivulje prvog momenta
<b>BCS</b>	engl. <i>Biopharmaceutics Classification System</i>	Biofarmaceutska klasifikacija lijekova
<b>CHMP</b>	engl. <i>Committee for Medicinal Products for Human Use</i>	Povjerenstvo za humane lijekove pri Europskoj agenciji za lijekove
<b>CQA</b>	engl. <i>Critical Quality Attributes</i>	Ciljani profil kvalitete proizvoda
<b>DSC</b>	Engl. <i>Differential Scanning Calorimetry</i>	Diferencijalna pretražna kalorimetrija
<b>EE</b>	engl. <i>Encapsulation Efficiency</i>	Uspješnost uklapanja lijeka
<b>EMA</b>	engl. <i>European Medicines Agency</i>	Europska agencija za lijekove
<b>FDA</b>	engl. <i>Food and Drug Administration</i>	Američka agencija za lijekove
<b>FFF</b>	engl. <i>Field-flow Fractionation</i>	Analitička tehnika razdvajanja protočnim poljem
<b>HIV</b>	engl. <i>Human Immunodeficiency virus</i>	Virus humane imunodeficijencije
<b>HLB</b>	engl. <i>Hydrophilic-lipophilic Balance</i>	Hidrofilno-lipofilna ravnoteža
<b>HME</b>	engl. <i>Hot-melt Extrusion</i>	Hot-melt ekstruzija
<b>HPH</b>	engl. <i>High Pressure Homogenization</i>	Visoko tlačna homogenizacija
<b>HSV</b>	engl. <i>Herpes Simplex Virus</i>	Herpes simpleks virus
<b>LBDD</b>	engl. <i>Lipid Based Drug Delivery System</i>	Terapijski sustavi temeljeni na lipidima
<b>LC</b>	engl. <i>Loading Capacity</i>	Kapacitet uklapanja lijeka
<b>LD</b>	engl. <i>Laser Diffraction</i>	Laserska difrakcija
<b>LDC</b>	engl. <i>Lipid Drug Conjugate</i>	Konjugat lipid-lijek
<b>MRT</b>	engl. <i>Mean Residence Time</i>	Prosječno vrijeme zadržavanja

<b>NLC</b>	engl. <i>Nanostructured Lipid Carrier</i>	Nanostrukturirani lipidni nosač
<b>PCS</b>	engl. <i>Photon Correlation Spectroscopy</i>	Fotonska korelacijska spektroskopija
<b>PEG</b>	engl. <i>Polyethylene glycol</i>	Polietilen glikol
<b>RH</b>	engl. <i>Relative Humidity</i>	Relativna vlažnost
<b>RNA</b>	engl. <i>Ribonucleic Acid</i>	Ribonukleinska kiselina
<b>SEM</b>	engl. <i>Scanning Electron Microscopy</i>	Skenirajuća elektronska mikroskopija
<b>siRNA</b>	engl. <i>Small-interfering Ribonucleic Acid</i>	Mala interferirajuća ribonukleinska kiselina
<b>SLN</b>	engl. <i>Solid Lipid Nanoparticle</i>	Čvrsta lipidna nanočestica
<b>UV/VIS</b>	engl. <i>Ultraviolet/Visible Spectroscopy</i>	Ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija